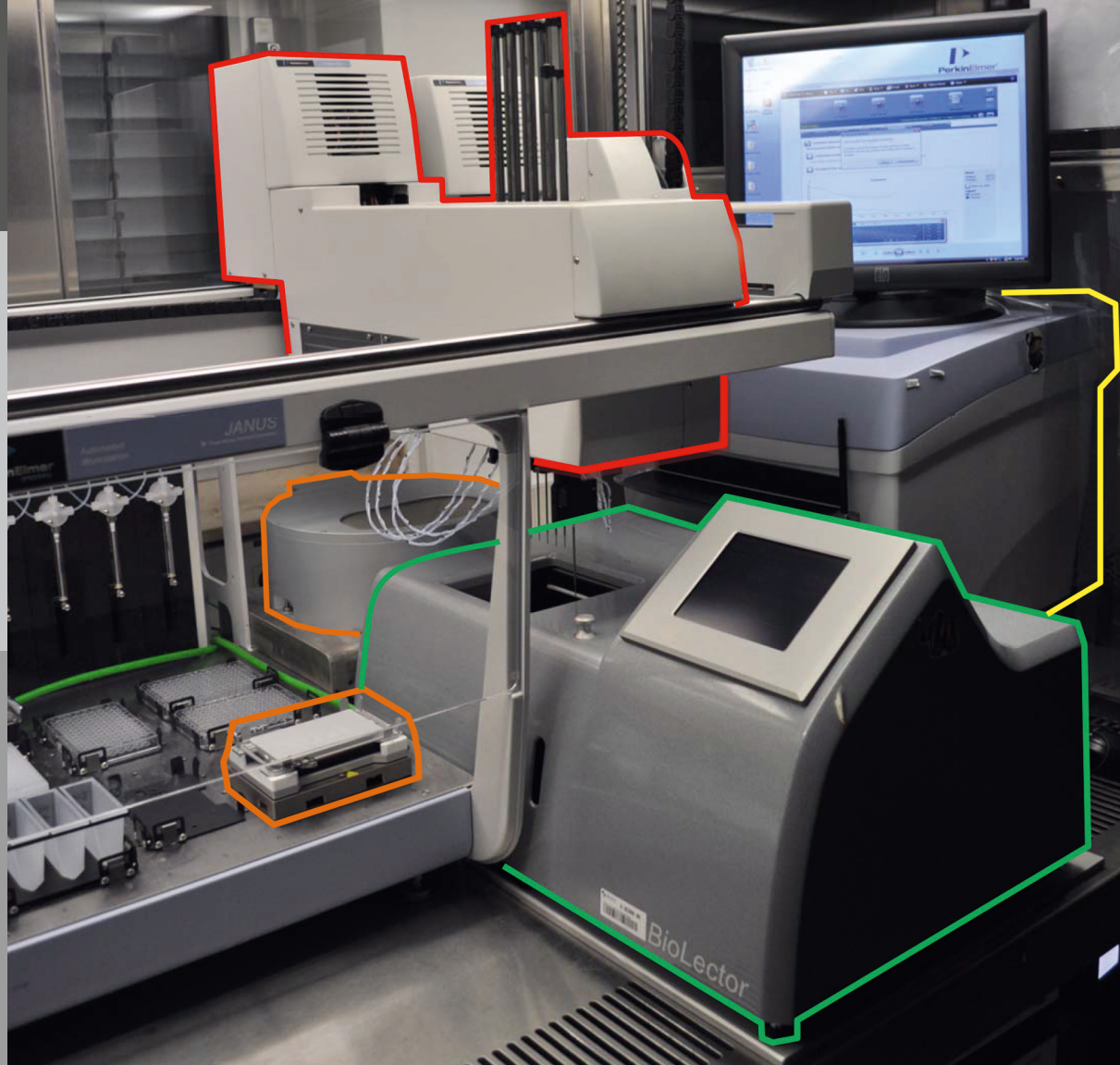


Kultivierung

Probenahme

Verarbeitung

Analytik



Prozessnahe Hochdurchsatzoptimierung der heterologen Proteinproduktion in alternativen Wirtsorganismen

Peter Rohe

Forschungszentrum Jülich GmbH
Institut für Bio- und Geowissenschaften (IBG)
Biotechnologie (IBG-1)

Prozessnahe Hochdurchsatzoptimierung der heterologen Proteinproduktion in alternativen Wirtsorganismen

Peter Rohe

Schriften des Forschungszentrums Jülich
Reihe Gesundheit / Health

Band / Volume 58

ISSN 1866-1785

ISBN 978-3-89336-834-1

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek.
Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der
Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte Bibliografische Daten
sind im Internet über <<http://dnb.d-nb.de>> abrufbar.

Herausgeber und Vertrieb: Forschungszentrum Jülich GmbH
Zentralbibliothek, Verlag
D-52425 Jülich
Telefon (02461) 61-5368 · Telefax (02461) 61-6103
E-Mail: zb-publikation@fz-juelich.de
Internet: <http://www.fz-juelich.de/zb>

Umschlaggestaltung: Grafische Medien, Forschungszentrum Jülich GmbH

Druck: Grafische Medien, Forschungszentrum Jülich GmbH

Copyright: Forschungszentrum Jülich 2012

Schriften des Forschungszentrums Jülich
Reihe Gesundheit / Health Band / Volume 58

D 82 (Diss., RWTH Aachen University, 2012)

ISSN 1866-1785
ISBN 978-3-89336-834-1

Vollständig frei verfügbar im Internet auf dem Jülicher Open Access Server (JUWEL)
unter <http://www.fz-juelich.de/zb/juwel>

Alle Rechte vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf in irgendeiner Form (Druck, Fotokopie oder in einem anderen Verfahren) ohne schriftliche Genehmigung des Verlages reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wird die Entwicklung automatisierter Hochdurchsatzmethoden zur Optimierung der heterologen Proteinproduktion beschrieben. Hierzu werden im ersten Teil der Arbeit die technischen Voraussetzungen geschaffen, indem eine automatisierte Kultivierungsplattform - dem Jülich Bioprocess Optimization System (JuBOS) - konzipiert und validiert wird. Die beiden Hauptinstrumente sind hierbei ein Mikrotiterplatten (MTP) - basiertes Kultivierungssystem und ein angebundener Pipettierroboter, durch den u.a. ein Flüssigkeitstransfer in und aus den einzelnen MTP-Kavitäten ermöglicht wird. Funktionale Erweiterungen des Systems durch weitere Instrumente ermöglichen auf dem JuBOS automatisierte mikrobielle Arbeiten wie z.B. Probenahme und Aktivitätsassays. Durch eine Maßstabsvergrößerung verschiedener MTP-Kultivierungen in Labor-Bioreaktoren (1 L, 20 L) wird die Validität der Ergebnisse nachgewiesen.

In dem zweiten Teil der Arbeit werden auf dem JuBOS vier Methodenmodule zur beschleunigten Bioprozessentwicklung der heterologen Proteinproduktion entwickelt. Als Modellprotein wurde hierzu Cutinase aus *Fusarium solani pisi* verwendet, sekretorisch produziert mit *Corynebacterium glutamicum*. In dem ersten Methodenmodul werden aus einer Signalpeptid-Bibliothek durch ein automatisiertes Stammscreening die produktivsten Cutinase-Signalpeptid-Kombinationen identifiziert. Als bioverfahrenstechnische Optimierung wird mit der Methode des sogenannten *Induction Profilings* optimale Kombinationen von IPTG-Konzentration und Induktionszeitpunkt verschiedener Modellproteine untersucht. Neben einer Produktivitätssteigerung von 40% wird ebenfalls ein deutlicher Einfluss des Zielproteins selbst deutlich. Als weiterer Parameter wird das Minimalmediums CG XII hinsichtlich maximaler Proteinproduktion mit *C. glutamicum* optimiert. Durch ein Screening von 19 Medienkomponenten und einer Algorithmen-basierten Optimierung wird ein neues Minimalmedium entwickelt, mit dem die Ausbeute von zwei Zielproteinen um den Faktor 1.5 gesteigert wird. Als abschließende Methode zur Bioprozessoptimierung wird die Möglichkeit zur Miniaturisierung von Fed-Batch-Prozessen mit Hilfe eines enzymatischen Glucose-Release-Mediums untersucht. Hierdurch ist eine systematische Variation der linearen Feedrate bereits in Mikrotiterplatten möglich und die biomassespezifische Produktbildung um 100% gesteigert.

Im einfachsten Fall einer Prozessoptimierung werden diese beschriebenen Methoden nacheinander abgearbeitet. Bei einer solchen Kette von Optimierungsschritten wird mit dem JuBOS der Durchsatz einer Bioprozessentwicklung um den Faktor 17 im Vergleich zu parallelen Bioreaktorkultivierungen gesteigert.

Abstract

This work includes the development of automated high-throughput methods for optimizing heterologous protein production. In the first part of the work, the automated cultivation platform named “Jülich Bioprocess Optimization System” (JuBOS) is designed and validated. The two main parts are a microtiter plate (MTP)-based cultivation system and a pipetting robot platform. The robot enables fluid transfer in and out of the MTP wells during cultivation. Further instrument integrations enable automated microbial work on the JuBOS, like sample handling and enzyme activity assays. MTP cultivations of various protein producer strains are successfully scaled up to laboratory bioreactors with volumes of 1 L and 20 L showing the validity of the results.

In the second part, four methods for enhancing bioprocess optimization have been developed and applied. Mostly cutinase from *Fusarium solani pisi* secreted with *Corynebacterium glutamicum* was used as recombinant model protein. In the first method an automated strain screening results in an appropriate selection of signal peptide/cutinase combinations with higher precision than hitherto screening methods. As first biochemical engineering parameter, optimal combinations of IPTG concentration and induction time are evaluated with the *Induction Profiling*. Besides an impact of the two parameters on the product yield, also the target protein itself influences the optimum. The third method of this work is the automated media optimization shown for CG XII minimal media optimized for protein production. A screening of 19 media components and a subsequent algorithm-based optimization leads to a new minimal medium, which increases the yield by factor 1.5. Furthermore, the possibility of miniaturization of fed-batch processes using an enzymatic glucose release medium is shown.

In the simplest case, these optimization methods are carried out subsequently. In such a sequence, the throughput of a bioprocess optimization is enhanced by factor 17 compared to parallel bioreactor cultivations.

Teile der Arbeit wurden bereits als Beiträge in Zeitschriften oder auf Konferenzen veröffentlicht.

Artikel in Zeitschriften:

Rohe P, Venkanna D, Kleine B, Freudl R, Oldiges M: An automated workflow for enhancing microbial bioprocess optimization on a novel microbioreactor platform. *Microb Cell Fact* 2012, 11:144.

Rohe P, Noack S, Wiechert W, Oldiges M: Optimierung heterologer Proteinproduktion in der Mikrotiterplatte. *Chem-Ing-Tech* 2010, 82:1550-1550.

Vorträge auf Konferenzen:

Rohe P. Liquid Handling meets microscale cultivation: a booster for bioprocess optimization. Invited keynote lecture on *bioprocessUK*, November 2011, Glasgow, UK.

Rohe P, Venkanna D, Schweissgut P, Freudl R, Wiechert W, Oldiges M: Launching an Automated Microtiter Cultivation Platform for Enhanced Bioprocess Optimization. *2nd High throughput process development conference*, June 2012, Avignon, France.

Rohe P, Venkanna D, Freudl R, Wiechert W, Oldiges M: Automated microtiter plate based cultivations for optimisation of secretory protein production. *ACHEMA* 2012, Frankfurt, Germany.

Poster auf Konferenzen:

Rohe P, Noack S, Wiechert W, Oldiges M: Bioprozessentwicklung mit höherem Durchsatz: Optimierung heterologer Proteinproduktion in der Mikrotiterplatte. Poster at *DECHEMA Jahrestagung*, October 2010, Aachen, Germany.

Rohe P, Corsten S, Klein K, Wiechert W, Oldiges M: Bioprocess development with higher throughput: Optimizing heterologous protein expression in the microtiterplate. ESF-BU-CeBiTec Conference *Microbes and Industrial Biotechnology*, November 2010, Bielefeld, Germany.

Rohe P, Venkanna D, Noack S, Wiechert W, Oldiges M: JuBOS: A Bioprocess Optimization System For Enhanced Development Of Heterologous Protein Production. *First european conference of applied biotechnology*, September 2011, Berlin, Germany

„Wahrlich es ist nicht das Wissen, sondern das Lernen, nicht das Besitzen, sondern das Erwerben, nicht das Da-Seyn, sondern das Hinkommen, was den größten Genuss gewährt.“

KARL FRIEDRICH GAUß

„Der Wissenschaftler findet seine Belohnung in dem, was Poincaré die Freude am Verstehen nennt, nicht in den Anwendungsmöglichkeiten seiner Erfindung“

ALBERT EINSTEIN

Danksagung

Ohne die Mithilfe vieler Menschen wäre die Arbeit nicht in der jetzigen Form zustande gekommen. Für diese Unterstützung bedanke ich mich insbesondere bei den folgenden Personen:

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Wiechert, Leiter der Systembiotechnologie am Institut für Bio- und Geowissenschaften, danke ich für die Überlassung des Promotions-Themas und für die Schaffung sehr guter Arbeitsbedingungen. Frau Prof. Dr.-Ing. Antje Spieß danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und die Hilfe während des Promotionsverfahrens.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Marco Oldiges, Leiter der Arbeitsgruppe Bioprozesse und Bioanalytik, für die Betreuung der Promotion, seine ständige Diskussionsbereitschaft sowie seine dauerhafte persönliche Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt David Kranz, Stephanie Corsten und Deepak Venkanna für ihre Beiträge und Diskussionen während ihrer Praktika und Abschlussarbeiten.

Bei Frank Kensy (m2p-labs), Jens Hamann (PerkinElmer) und Mario Fricke (Institut für Bio- und Geowissenschaften) möchte ich mich für ihre konstruktive Mithilfe bei der Konzeption der Robotik-Anlage bedanken.

Juri Feimann, Kathrin Scholz und Britta Kleine danke ich für ihre Ratschläge und Mithilfe bei molekularbiologischen Arbeiten, Oliver Schweissgut für die Unterstützung bei der computergetriebenen Medienoptimierung, sowie Nina Pfelzer für die von ihr erstellten Methoden zur enzymatischen Glucosefreisetzung. Hans-Jürgen Brandt danke ich für seine Mitarbeit im Biotechnikum und Stephan Miebach für das Korrekturlesen der Arbeit. Bei der gesamten Arbeitsgruppe Bioprozesse und Bioanalytik - besonders bei den Kollegen in meinem Büro - möchte ich mich für die hilfsbereite und freundschaftliche Atmosphäre auch außerhalb der Arbeitszeiten bedanken.

Meinen Eltern Gabriele und Elmar Rohe danke ich für die Unterstützung und die überlassenen Freiheiten.

Ganz besonders bedanke ich mich bei meiner Freundin und Wegbegleiterin Elena, die mir durch Unterstützung und Liebe während meiner Promotionsarbeit einen wichtigen Ausgleich schenkte.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
2	MOTIVATION UND ZIELSETZUNG	5
3	THEORETISCHE GRUNDLAGEN	8
3.1	Mikrobielle Proteinproduktion	8
3.2	Bioprozesskinetik	14
3.3	Sauerstoffeintrag in Bioreaktoren	21
3.4	Kriterien zur Maßstabsvergrößerung	26
3.5	Statistische Versuchsplanung in der Bioprozessoptimierung	32
4	MATERIAL UND METHODEN	35
4.1	Stämme	35
4.2	Plasmide.....	35
4.3	Nährmedien.....	36
4.4	Analytik	38
4.5	Kultivierungssysteme.....	43
4.6	Robotik	45
5	SYSTEMAUFBAU UND VALIDIERUNG	47
5.1	Aufbau der automatisierten Kultivierungsplattform.....	47
5.2	Validierung der automatisierten Kultivierungsplattform	59
6	HOCHDURCHSATZOPTIMIERUNG DER PROTEINPRODUKTION	75
6.1	Screening von Signalpeptiden.....	76
6.2	Induktionsoptimierung verschiedener Zielproteine	97
6.3	Medienoptimierung für die Proteinsekretion von <i>Corynebacterium glutamicum</i>	109
6.4	Optimierung der Feedrate für <i>Corynebacterium glutamicum</i>	125
7	ZUSAMMENFASSUNG	135
8	AUSBLICK.....	141
9	ANHANG	143
9.1	Laborplanung für die Robotik.....	143
9.2	Screenshots der Software.....	144
9.3	Einfluss des Gains auf die Online-Analytik.....	145
9.4	Kühlung von Flüssigkeiten auf dem Roboter-Deck.....	146
9.5	Diagramme: Optimierung der Feedrate	147
10	LITERATURVERZEICHNIS	149

Abkürzungsverzeichnis

Tabelle I: Liste der verwendeten Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
a.u.	Arbitrary Unit
BHI	Brain Heart Infusion
BSLA	<i>Bacillus subtilis</i> lipase A
CCD	Central Composite Design
CSV Datei	Comma Separated Value Datei
DoE	Design of Experiments
DSP	Downstream Processing
DWP	Deepwellplate
EA	Enzymaktivität
FbFP	Flavin-based Fluorescent Protein
FDA	Food- and Drug- Administration
FFD	Full Factorial Design
FL	Fluoreszenz
FP	Flowerplate
GA	Genetischer Algorithmus
GFP	Green Fluorescent Protein
Glc	Glucose
GRAS	Generally Regarded As Safe
HCDC	High Cell Density Cultivation
HEPA	High Performance Particle Filter
HTC	High Throughput Cultivation
HTS	High Throughput Screening
IB	Inclusion Bodies
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
JuBOS	JUELICH BIOPROCESS OPTIMIZATION SYSTEM
MBR	Mikrobioreaktor
MOPS	3-(N-morpholino)propansulfonsäure
MTP	Microtiter Plate (dt.: Mikrotiterplatte)
OEM	Original Equipment Manufacturer
OFAT	One-Factor-At-the-Time
PLS	Prozessleitsystem
RT	Raumtemperatur
SEC	Secretion
SP	Signalpeptid
STR	Stirred Tank Reactor
TAT	Twin-Arginin-Translocation
USP	Upstream Processing
YFP	Yellow Fluorescent Protein

Tabelle II: Liste verwendeter Formelzeichen

Formelzeichen	Einheit	Bedeutung
m_E	$\text{mmol}\cdot\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$	Erhaltungsstoffwechsel- Koeffizient
p_{O_2}	Bar	Sauerstoffpartialdruck
$Y_{X/S}$		Ausbeutekoeffizient
μ	h^{-1}	Spezifische Wachstumsrate
c	$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	Konzentration
V	L	Volumen
K_V	L	Volumenkonstante
t	S	Zeit
F	$\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$	Feedrate
R	$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$	Rate
Q	h^{-1}	Spezifische Rate
ρ	$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	Dichte
η	$\text{mPa}\cdot\text{s}$	Viskosität
A	m^2	Phasengrenzfläche
V_L	m^3	Flüssigkeitsvolumen
A	m^{-1}	Volumenspezifische Phasengrenzfläche
OTR	$\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$	Oxygen Transfer Rate
k_L	$\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$	Stoffübergangskoeffizient auf Flüssigkeitsseite
H	M	Höhe
D	M	Durchmesser
v_{Tip}	$\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$	Rührerspitzen- Geschwindigkeit
P	W	Leistung
v_g	$\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$	Gasleerrohr- Geschwindigkeit
FL	a.u.	Fluoreszenz
BS	a.u.	Backscatter
EA	$\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$	Enzymaktivität

Tabelle III: Liste der verwendeten Indize

Index	Bedeutung
Spez	biomassespezifisch
X	Biomasse
P	Produkt
R	Reaktor
I	Innen-
0	Wert der Feedlösung
Max	Maximalwert

1 EINLEITUNG

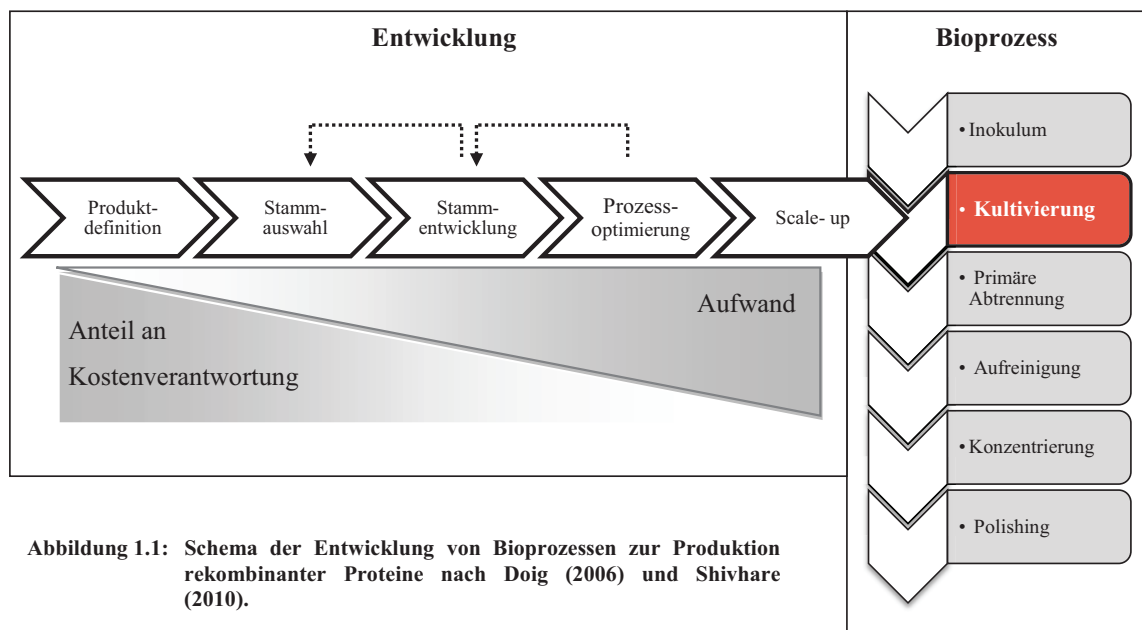
Die Nutzung von Mikroorganismen wurde bereits in den ersten Aufzeichnungen der Menschheitsgeschichte dokumentiert, z.B. zur Produktion von Nahrungsmitteln und alkoholischen Getränken. So beschrieb Homer bereits ca. 800 v. Chr. in den Ilias-Schriften die Herstellung von Käse aus Ziegenmilch unter Zuhilfenahme von Magensaft. Lange Zeit wurde für bioaktive Substanzen wie Hefe oder eben solche Verdauungsenzyme das Wort „Ferment“ verwendet. Mit der Ausbreitung der modernen Naturwissenschaften im 18. und 19. Jahrhundert wurden biokatalytische Stoffumsetzungen systematischer untersucht, und durch die Einführung des Begriffs „Enzym“ das nicht-lebende Ferment von lebendem Ferment (also Mikroorganismen) unterschieden. Die Nutzbarmachung der verwendeten Proteine erfolgte bis in das 20. Jahrhundert hinein konventionell durch Gewinnung von pflanzlichem, tierischen oder mikrobiellem Rohmaterial, wie z.B. das Labferment aus Kälbermägen oder später Insulin aus tierischen Bauchspeicheldrüsen.

Durch die Erfindung rekombinanter DNA-Techniken wurden in den 1970er Jahren die Möglichkeiten für die Herstellung von Proteinen grundlegend verändert. Durch das Einbringen von Fremd-DNA in *E. coli* wurde in dieser Zeit erstmals rekombinantes, menschliches Insulin als Therapeutikum hergestellt und als Medikament (HumulinTM) zugelassen. Zu Beginn des 21. Jahrhunderts wurden basierend auf diesen Techniken jährlich mehr als 10 Tonnen Insulin mit einem Wert von mehr als 3 Mrd. Euro hergestellt (Buchholz et al. 2005). Die Entschlüsselung des menschlichen Genoms, sowie die fortschreitende Entwicklung gentechnischer Methoden bewirkten in den letzten zehn Jahren einen starken Zuwachs von biotechnisch hergestellten Arzneimitteln. Das weltweite Marktvolumen von therapeutischen Proteinen als Biopharmazeutika betrug 2010 jährlich 46 Mrd. Euro (Walsh 2010). Weiterhin werden Enzyme seit den 1960er Jahren u.a. in Waschmitteln zur schonenden Beseitigung von Verschmutzungen verwendet. Ebenso haben die milden Reaktionsbedingungen und die Selektivität der Biokatalysatoren Vorteile in Prozessschritten zur Herstellung von Feinchemikalien gegenüber konventionellen chemischen Verfahren (Schmid et al. 2001).

Die Herstellung solcher rekombinanten Proteine erfolgt wie in anderen verfahrenstechnischen Herstellungsverfahren in aufeinander folgenden Schritten, den Grundoperationen (engl.: Unit Operations). In Bioprozessen erfolgt die erste grob gefasste Einteilung in Upstream- und Downstream- Prozesse. Zu den Upstreamprozessen zählt die Kultivierung der Produktionsorga-

nismen in Bioreaktoren sowie alle anfallenden Vorarbeiten hierzu, wie z.B. die Stammhaltung, Anzucht des Inokulums, die Medienerstellung und Sterilisation. Alle Grundoperationen nach der Kultivierung werden als Downstreamprozesse bezeichnet. Nach einer primären Abtrennung von Biomasse und Flüssigkeit folgen z. B. chromatographische Methoden oder Filtrationen zur Aufreinigung der rekombinanten Proteine. Die jeweils notwendigen Prozessschritte und deren Entwicklung ergeben sich aus der anfänglichen Produktdefinition und den damit verbundenen Zielgrößen wie Produktart, Menge, Reinheit.

Die Entwicklung der Upstreamprozesse rekombinanter Proteine wird von Doig (2006) wie in Abbildung 1.1 eingeteilt. Nach der Produktdefinition und der Stammauswahl („Cell Screening“), werden die Produktionseigenschaften der Stämme verbessert („Cell enhancement“), anschließend die Kultivierungsbedingungen optimiert („Process optimization“) und in den benötigten Produktionsmaßstab überführt („Scale-up“). Von dieser linearen Abfolge wird ggf. durch Rückschritte abgewichen, da beispielsweise im Vorfeld unbekannte Bedingungen eine neue Stammauswahl notwendig machen.



In den ersten drei Entwicklungsphasen von industriellen Bioprozessen werden entscheidende Parameter festgelegt, die bei einem späteren Scale-up möglichst unverändert übertragen werden sollen (Schmidt 2005). Eine Rückkopplung von der Maßstabsvergrößerung in die Stamm- und

Prozessoptimierung wird also nur selten durchgeführt. Dies zeigt die Tragweite der Entscheidungen, die in dieser frühen Entwicklungsphase getroffen werden. Dass in der Forschungsphase Maßnahmen zwar leicht zu revidieren sind, aber mit fortschreitender Entwicklung einen starken Einfluss auf den weiteren Projektverlauf haben (s. Begriffe „Kostenverantwortung“ und „Aufwand“ in Abbildung 1.1) wurde auch in Planungsmodellen industrieller Anlagen hinreichend beschrieben (Aggteleky 1982; Eversheim 2000).

Für unterschiedliche Produktklassen wie z. B. Aminosäuren, Polymere oder eben rekombinante Proteine können für einen optimalen Prozess einige Parameter basierend auf Vorkenntnissen eingegrenzt oder sogar festgelegt werden. So ist die Zulassung von einem GRAS-Organismus einfacher als die von unbekannten Stämmen. Einige Organismen besitzen darüber hinaus bereits optimierte physiologische Eigenschaften und lassen sich durch die zur Verfügung stehenden molekularbiologischen Werkzeuge in der Stammentwicklung einfach genetisch manipulieren. Auch bei der Prozessoptimierung wird meist auf bestehende Kultivierungsmethoden und Erfahrungswerte zurückgegriffen. So werden im Allgemeinen gut charakterisierte Rührreaktoren definierter Geometrie verwendet und Prozessparameter wie pH-Wert, Standardmedien und Zufütterungsprofile von bekannten Prozessen übernommen und ggf. angepasst.

Mit dem neuen Forschungsfeld der Systembiotechnologie entstehen vor allem bei der Herstellung von Primärstoffwechselprodukten wie z. B. Aminosäuren computergestützte Werkzeuge, um die Wahl zu optimierender Parameter *in-silico* eingrenzen zu können (Park et al. 2005; Stephanopoulos 1999). Solche empirischen oder mechanistischen Modelle sind aber zur Herstellung rekombinanter Proteine bisher nur selten angewendet worden (Ian 2005; Terpe 2006). Auch nach jahrzehntelanger Forschung gilt, dass für neu zu produzierende Proteine eine hohe Zahl von Parametern in einem vergleichsweise weiten Bereich *de-novo* optimiert werden muss (Baneyx 1999; Dragosits et al. 2011; Weickert et al. 1996).

Bei einer Optimierung der Proteinproduktion sind sowohl biologische, als auch verfahrenstechnische Parameter entscheidend (vgl. hierzu auch Kapitel 3.1). Hierzu zählen die Stamm-Vektor-Kombination, Transport des Proteins durch die Zellwand, Expressionsstärke, Induktionszeitpunkt, Temperatur, Medienzusammensetzung und die Wachstumsrate, um nur einige zu nennen. Würde man in der experimentellen Optimierung all diese Parameter miteinander kombinieren, ergäbe sich eine mit jedem weiteren Parameter kombinatorisch explodierende Versuchszahl. Die Zeit und der Aufwand, um alle Parameterkombinationen zu testen, wären zu groß. Meist werden aus diesem Grund optimierte Parameter aus vorherigen Prozessen für neue Prote-

inproduktionen übernommen, was aber dazu führt, dass sich viele interessante Proteine nur in sehr geringer Konzentration oder sogar gar nicht rekombinant produzieren lassen (Ian 2005). Durch eine Trennung der molekularbiologischen *Stammentwicklung* und der verfahrenstechnischen *Prozessoptimierung* (vgl. Abbildung 1.1) kann es durch negativ wirkende kombinatorische Effekte zwischen technischen und biologischen Parametern zu den unerwünschten, teils kostenintensiven Rückschritten in der Entwicklungskette kommen.

Um den hohen experimentellen Aufwand auf ein praktikables Maß einzudämmen, können durch Werkzeuge wie der statistischen Versuchsplanung (vgl. hierzu auch Kapitel 3.5) die Anzahl der Versuche verringert und durch die Anwendung parallelisierter Kultivierungen der experimentelle Durchsatz erhöht werden. Da aber auch mit diesen Methoden nicht alle Parameterkombinationen untersucht werden können, ist für zukünftige Bioprozessoptimierungen die Information von großer Bedeutung, welche Parameter sich gegenseitig beeinflussen und wieso sich einige Proteine unter bestimmten Bedingungen produzieren lassen, aber andere Proteine nicht.

2 MOTIVATION UND ZIELSETZUNG

DIE MOTIVATION dieser Arbeit ist die Optimierung der heterologen Proteinproduktion als wesentlicher Baustein zur schnellen Entwicklung wirtschaftlicher Bioprozesse. Zur Beschleunigung der Entwicklungszeit sollten Optimierungsexperimente mit einem möglichst hohen Durchsatz durchgeführt werden, nach Möglichkeit unter Berücksichtigung verfahrenstechnisch kontrollierter Bedingungen. Diese definierten Bedingungen sollen zu skalierbaren, informationsreichen Ergebnissen bereits in der frühen Entwicklungsphase führen. Wie im Kapitel 1 dargelegt, müssen Kultivierungsexperimente dennoch in hoher Zahl durchgeführt werden, wobei definierte Bedingungen durch verschiedene Methoden eingestellt werden können.

Ein häufig verwendetes Werkzeug ist der Modell-Bioreaktor, oder auch Labor-Bioreaktor mit Volumina zwischen 0.25 L und 5 L, in dem konstante Bedingungen bzgl. des Sauerstoffeintrags, des pH-Wertes, und der Temperatur herrschen. Ein Laborant kann für aussagekräftige Ergebnisse mit dieser etablierten Methodik etwa 15 Kultivierungsansätze parallel bearbeiten. Durch die Verwendung von Schüttelkolben kann der experimentelle Durchsatz nochmals etwa verdoppelt werden, wobei bei dieser Methode selten definierte Reaktionsbedingungen eingestellt werden. Bei auf Mikrotiterplatten (MTP) basierenden Methoden können mit Hilfe einer Robotikplattform sogar bis zu 30000 Ansätze pro Tag getestet werden (Hallborn and Carlsson 2002). Der hierbei erzielte Informationsgewinn für die spätere Bioprozessentwicklung ist jedoch aufgrund meist undefinierter Bedingungen weit geringer als in anderen Reaktionssystemen. Sowohl bei Modell-Bioreaktoren, als auch bei Schüttelkolben und MTP-Methoden stehen sich also der experimentelle Durchsatz und die gewonnene Information gegenüber. Diese Gegenüberstellung lässt sich in einer Matrix veranschaulichen (Abbildung 2.1), in der sich die jeweiligen Kultivierungsmethoden je nach Durchsatz und Informationsgewinn anordnen lassen (Betts and Baganz 2006; Doig 2006).

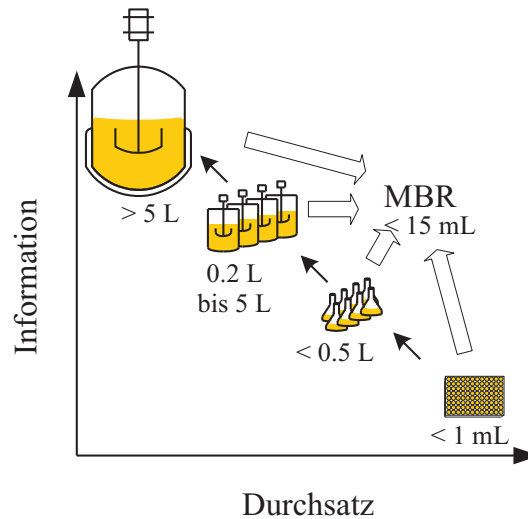


Abbildung 2.1: Einordnung von Mikrobioreaktoren (MBR): Matrix zur Einordnung von Mikrotiterplatten, Schüttelkolben, Laborbioreaktoren und Pilotbioreaktoren anhand des jeweiligen Durchsatzes und der gewonnenen Prozessinformation, nach Doig (2006).

In den letzten Jahren wurde der Begriff Mikrobioreaktor (MBR) geprägt (Amanullah et al. 2010; Betts and Baganz 2006; Duetz 2007; Kensy and Muller 2007; Puskeiler et al. 2005a), der von verschiedenen Autoren jeweils unterschiedlich ausgelegt wird. In einigen Arbeiten werden die MBR als miniaturisierte und gerührte Bioreaktoren beschrieben, die in der Regel eine ähnliche Reaktorgeometrie und Sauerstoffversorgung wie Modellbioreaktoren aufweisen (Puskeiler et al. 2005a). Ein weiteres Konzept für MBR sind (geschüttelte) Blasensäulen unter Messung und Regelung wichtiger verfahrenstechnischer Größen wie dem pH-Wert und dem Sauerstoffpartialdruck p_{O_2} (Isett et al. 2007). Andere Autoren bezeichnen darüber hinaus MTP-basierte Kultivierungsmethoden als MBR, da auch hier ein Sauerstoffeintrag vergleichbar zu Modellbioreaktoren erreicht werden kann. Wichtigstes gemeinsames Merkmal aller Ansätze ist die Messung von Kultivierungsparametern (z.B. pH und p_{O_2}) sowie ein hoher und bekannter Stofftransport für skalierbare Ergebnisse.

Hieran anknüpfend ist das Ziel dieser Arbeit, die Optimierung der Proteinproduktion mit hohem Durchsatz unter möglichst kontrollierten Bedingungen mit Hilfe eines MBR-Systems durchzuführen. Für eine Beschleunigung der Arbeiten sollen alle zeitkritischen Arbeitsschritte, wie z.B. Medienerstellung und Probenverarbeitung, soweit wie möglich automatisiert werden. Das

MBR-System soll für diese Automatisierung in eine Robotik-Anlage integriert werden, die über deren Standardmethoden hinaus einen Flüssigkeitstransfer in oder aus den Reaktoren gewährleistet. Sowohl Pipettierroboter, als auch verschiedene MBR-Systeme sind zu heutiger Zeit kommerziell verfügbar. Eine für mikrobielle Arbeiten voll funktionsfähige Kombination beider Elemente muss jedoch zunächst konzipiert und danach durch zielführende Systemtests in Betrieb genommen werden (Ahn et al. 2007; Huber et al. 2009; Puskeiler et al. 2005a). Daher werden in dieser Arbeit Protokolle und automatisierte Optimierungsmethoden anhand der heterologen Proteinproduktion validiert. Hierbei müssen die Ergebnisse aus dem MBR-System mit Ergebnissen aus etablierten Modell-Bioreaktoren (z. B. mit $V = 1\text{ L}$ und 20 L) verglichen werden, um dadurch deren Relevanz für einen späteren Produktionsprozess darzulegen. Für diese Validierung wird Cutinase als Modellprotein für industriell relevante α/β -Hydrolasen (z.B. Subtilisin) verwendet.

Mit den erstellten Protokollen sollen anschließend Methoden zur Optimierung der heterologen Proteinexpression entwickelt werden, wobei auch hier die Cutinaseproduktion als Modellprozess dient. Hierbei sollen die Methoden einfach veränderbar sein, um somit die Anwendbarkeit auch für andere rekombinante Proteinproduktionen zu gewährleisten. Neben der Entwicklung eines Stammscreening-Verfahrens zur Auswahl produktiver biologischer Systeme, sollen Optimierungsmethoden für verschiedene verfahrenstechnische Parameter getestet werden, die einen möglichen Einfluss auf die rekombinante Proteinproduktion haben.

Hierbei ist die Frage relevant, ob das jeweils ermittelte Optimum vom Produktionswirt, bzw. vom Modellprotein abhängt. Nach Möglichkeit sollen also mit den Optimierungsmethoden verschiedene biologische Systeme untersucht werden. Die Arbeit soll dadurch einen Ausblick darauf geben, inwieweit schon beim Stammscreening verfahrenstechnisch optimierte Bedingungen beachtet werden müssen.

3 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

3.1 MIKROBIELLE PROTEINPRODUKTION

Rekombinante Proteine werden in vielen biotechnologischen Produkten und Verfahren verwendet und gelten dadurch als Schlüsselement der Biotechnologie. Sie werden in hochpreisigen Produkten wie Biopharmazeutika, bioanalytischen Kits oder molekularbiologischen Werkzeugen verwendet, bei denen entsprechend hohe Qualitätskriterien gefordert sind. Die Enzyme in der Textil-, Waschmittel-, oder Lebensmittelindustrie werden hingegen häufig als Rohextrakte eingesetzt, was deren Kosten im Downstream-Processing (DSP) in der Regel vermindert. Ungeachtet der späteren Anwendung werden rekombinante Proteine im Upstream-Processing (USP) mit sich ähnelnden Techniken *in-vivo* mittels pro-oder eukaryotischen Wirtsorganismen hergestellt. Welche Wirte und welches Verfahren eingesetzt werden, ist u.a. vom jeweiligen Zielprotein und den geforderte Qualitätskriterien abhängig. Die Zellen höherer Organismen (z.B. menschliche Tumorzelllinien, Insektenzellen) werden häufig zur Produktion komplexerer Proteine für Biopharmazeutika verwendet. Nach der Transkription und Translation erfolgt in den entsprechenden Zell-Kompartimenten eine Faltung der Proteine ggf. durch Bildung von Disulfid-Brücken und bei der Glycosylierung eine wirtsspezifische Verknüpfung mit Zuckern an Aminosäurereste der Peptidkette. In bakteriellen Wirten kann zwar keine Glycosylierung erfolgen, eine Bildung von Disulfid-Brücken hingegen ist durch einen Transport in den periplasmatischen Raum Gram-positiver Bakterien möglich. So wird *E. coli* beispielsweise zur Herstellung therapeutischer Antikörperfragmente verwendet, die mehrere Disulfidbrücken aufweisen können. Der Proteintransport wird auch bei Gram-negativen Organismen biotechnologisch verwendet, wobei hier die rekombinanten Proteine direkt in das umgebende Medium abgegeben werden (Choi and Lee 2004; Simonen and Palva 1993). So kann das DSP um den Zellaufschluss reduziert werden, der häufig mit einer Kontamination des Produkts mit DNA und Wirtsproteinen einhergeht.

3.1.1 Proteinsekretion und Signalpeptide

Aus Gram-negativen Bakterien (z. B. bei *Escherichia coli*) sekretierte Proteine verbleiben meist zwischen den Zellmembranen im Periplasma, wo sie einerseits Disulfidbrücken ausbilden können, andererseits aber auch zur Bildung von „Inclusion Bodies“ neigen (Choi and Lee 2004). Bei Gram-positiven Wirten (z. B. *Bacillus spec.*) werden sekretierte Proteine durch die Zellwand direkt in das umgebende Medium transportiert und erreichen dort eine im Vergleich zum intrazellulären Raum geringere Konzentration. Die Limitierung dieser Technik ist hauptsächlich die korrekte Proteinfaltung und nicht die Bildung von extrazellulären Inclusion Bodies.

Es sind mehrere Sekretionsmechanismen beschrieben, die sich in zwei generelle Gruppen einteilen lassen. Bei dem weitreichend beschriebenen SEC-Weg (von *Secretion*) werden ungefaltete und damit meist inaktive Proteine sekretiert (grüner Weg in Abbildung 3.1). Durch eine SEC-Sekretion wurde beispielsweise ein hoher Titer von 3 gL^{-1} rekombinanter α -Amylase mit *B. subtilis* erzielt (Palva 1982). Dem gegenüber steht der *Twin-Arginin-Translocation*- oder auch TAT-Weg (Chaddock et al. 1995), über den vor allem gefaltete und damit aktive Proteine transportiert werden (roter Weg in Abbildung 3.1). Von Bakterien wird dieser alternative Sekretionsweg genutzt um z.B. Redox-Cofaktor enthaltende Enzyme zu sekretieren (Berks et al. 2003). Diese Möglichkeit lässt sich ebenfalls biotechnologisch nutzen, um sekretierte Proteine zu gewinnen, deren Aktivität von der kovalenten Bindung eines Cofaktors im katalytischen Zentrum abhängt (Kikuchi et al. 2008b). Durch die TAT-Sekretion wird jedoch nur vereinzelt ein zur SEC-Sekretion vergleichbar hoher Titer erreicht, wie z.B. mit *C. glutamicum*, der 0.8 gL^{-1} einer aktiven Glutaminase (Kikuchi et al. 2008a). Durch Nutzung des SEC-Weges wird aber nicht immer einen vergleichbar hoher Produkttiter erreicht (Westers et al. 2004), genauso wenig wie die Nutzung des TAT-Weges immer zu 100% funktionalen Proteinen führt (DeLisa et al. 2003).

Die Entscheidung, über welchen Mechanismus die Proteine transportiert werden, ist durch Signalpeptide festgelegt, die mit dem Zielprotein fusioniert sind. Unter anderem für diese Entdeckung erhielt Günter Blobel im Jahr 2000 den Nobelpreis in Physiologie und Medizin (Blobel 2000). Signalpeptide haben in der Regel einen konservierten Aufbau (Abbildung 3.1, links) aus einer positive geladenen N-Region, einer hydrophoben H-Region und einer hydrophilen C-Region, in der die Erkennungssequenz für die *Signal Peptidase* (SPase) enthalten ist. Die Peptide interagieren co- bzw. posttranslational mit Sekretionsweg-spezifischen Elementen wie Chaperonen, Translokasen oder Proteasen, wodurch das Zielprotein durch die Zellwand dirigiert wird.

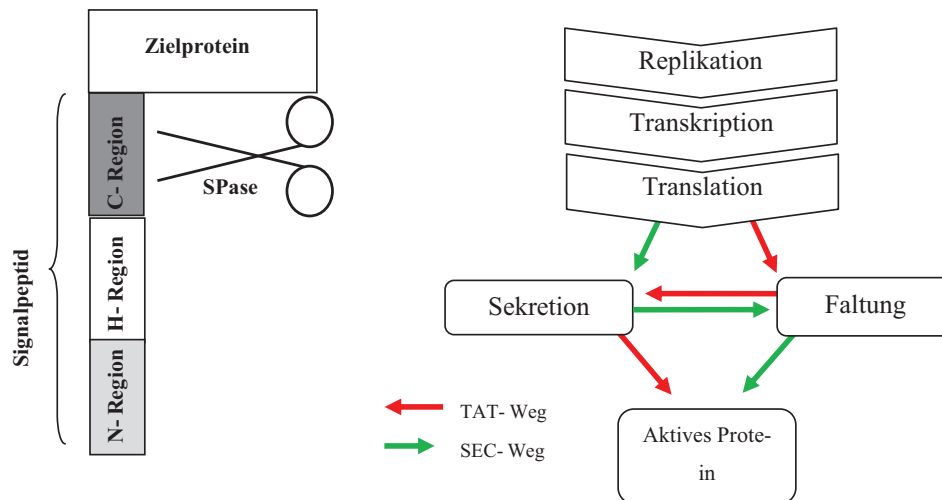


Abbildung 3.1: Konzepte der Proteinsekretion. Links: Prinzipieller Aufbau von Signalpeptiden. Die membran-gebundene SP Peptidase (SPase) spaltet das in der Membran verankerte Signalpeptid ab. H: Hydrophobe Region; N: positiv geladene Region; C: polare Region. Rechts: Sekretorische Proteinproduktion über den SEC-Weg (grün), und den TAT-Weg (rot).

Welches Signalpeptid in der rekombinanten Proteinproduktion zu einem hohen Titer im Überstand Gram-positiver Organismen führt, hängt von verschiedenen Faktoren ab. So gibt es in *B. subtilis* 300 Proteine, die jeweils unterschiedliche Signalpeptide haben (Tjalsma et al. 2000). Welches Signalpeptid sich bei der Produktion rekombinanter Proteine als effektiv erweist, hängt dabei auch vom zu produzierenden Zielprotein ab, was eine immer erneute Auswahl der Signalpeptide in Screeningversuchen erfordert (Brockmeier et al. 2006a). Seit der Entdeckung der Signalpeptide wurden Algorithmen entwickelt, die anhand der Aminosäuresequenz die Effizienz der Signalpeptide bewerten sollen (von Heijne 1986). Eine bekannte Kenngröße ist der D-Score der SignalP-Software (Dyrlov Bendtsen et al. 2004), deren Eignung zur Abschätzung guter und weniger guter Signalpeptide aber umstritten ist (Brockmeier et al. 2006a; Leggewie et al. 2010). So können Signalpeptide, die zwar eine schnelle Translokation durch die Zellwand bewirken, eine über den Kultivierungsverlauf schlechte Produktivität aufweisen (Caspers et al. 2010). Hierbei spielen nicht nur die Eigenschaften der Signalpeptide eine Rolle. Biologische und verfahrenstechnische Parameter sowie deren Kombinationen wirken sich positiv wie negativ auf die Proteinproduktion aus. Einige zur Produktionsoptimierung in Frage kommende Parameter sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst.

Tabelle 3.1: Parameter zur Optimierung der Proteinproduktion. Biologische und verfahrenstechnische Parameter, mit denen die Produktion rekombinanter Proteine optimiert werden kann. IB = Inclusion Bodies

Parameter	Kommentar	Literatur
Expressionswirt	Häufig wird auf etablierte Organismen wie <i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>P. pastoris</i> zurückgegriffen.	(Gustafsson et al. 2004)
Temperatur	Hat Einfluss auf den Zellmetabolismus und die Agglomeration rekombinanter Proteine.	(Dragosits et al. 2011)
Chaperon-Coexpression	Kann die Stabilität und die korrekte Faltung begünstigen.	(Hoffmann and Rinas 2004; Rosenau et al. 2004)
Signalpeptide	Können rekombinante Proteine aus der Zelle hinaus dirigieren.	(Brockmeier et al. 2006a; Tjalsma et al. 2000)
Promotor/ Induktionsstärke	Zu hohe Expressionsrate kann zu falscher Transkription und zur Bildung von IB führen.	(Lee et al. 1997; Studier 2005)
Induktionszeitpunkt	Ist bei toxischen Proteinen und starken Promotoren ein wesentlicher Parameter.	(Donovan et al. 1996; Levisauskas et al. 2003)
Gen-Copynumber	Kann durch die Wahl des Plasmids und dessen Stabilität beeinflusst werden.	(Kramer 1994)
Nährstoffversorgung/ Wachstumsrate	Hat direkten Einfluss auf den Zellmetabolismus.	(Curless et al. 1990; Jones and Anthony 1977)
Medienbestandteile, Nährstoffe	Können Einfluss auf den Zellmetabolismus und die Proteinstabilität und Aktivität haben.	(David et al. 2010; Lee et al. 1997)
Sauerstoffversorgung	Hat direkten Einfluss auf den Zellmetabolismus und kann bei Limitation die Plasmidstabilität herabsetzen.	(Konz et al. 1998)
Zielprotein	Optimale Parameter sind vom Zielprotein abhängig aufgrund z.B. toxischer Eigenschaften oder hohem Gehalt seltener Aminosäuren.	(Ahn et al. 2007; Brockmeier et al. 2006a; Hust et al. 2009)

3.1.2 Verwendete Organismen zur sekretorischen Proteinproduktion

Bacillus subtilis

Bacillus subtilis ist ein Gram-positives, aerob wachsendes, stäbchenförmiges Bakterium (s. Abbildung 3.2), das in der Natur normalerweise im Boden oder Gewässern vorkommt. Das als „*generally-regarded-as-safe*“ (GRAS) deklarierte Bakterium ist ein weithin verwendeter Plattformorganismus in der industriellen Biotechnologie wegen seiner nicht-pathogenen Eigenschaften, seiner unspezifischen Codon-Usage und der Eigenschaft, Proteine in großen Mengen in den

extrazellulären Raum transportieren zu können (Wong 1995). Die effizienten Sekretionsmechanismen von *B. subtilis* transportieren ca. 200 wirtseigene Proteine („Sekretom“) in den extrazellulären Raum (Tjalsma et al. 2000), wodurch sich bis zu 25 gL⁻¹ Gesamtprotein im Überstand befinden können. Diese Mechanismen werden in der industriellen Biotechnologie genutzt, um beispielsweise mit *Bacillus* Arten Waschmittelenzyme (Subtilisin) in großen Mengen herzustellen (Jaeger et al. 1999; Pierce et al. 1992).

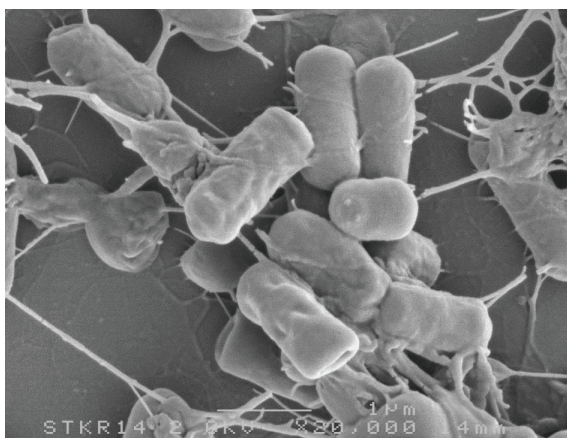


Abbildung 3.2: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *B. subtilis*-Zellen (Zweers et al. 2008).

Viele der Proteine, die von *B. subtilis* sekretiert werden, haben hydrolytische Aktivität, um komplexes organisches Material aus der Umgebung für die eigene Nährstoffversorgung nutzbar zu machen. In diesem Sekretom sind 27 wirtseigene Proteasen bekannt (Tjalsma et al. 2000), die in industriellen Nährmedien kostengünstige, aber auch schwer zu verwertende Komponenten wie z.B. Kartoffelschalenextrakte (Mukherjee et al. 2008) abbauen. Neben dem positiven Effekt der Nutzung wirtschaftlicher Nährmedien, sind rekombinante Zielproteine leider ebenfalls ein potentes Substrat dieser Proteasen. Durch einen Knock-out von sechs Proteasen wird der Abbau der Zielproteine vermindert und *B. subtilis* als Produktionsstamm etabliert (Wu et al. 1991). Weiterhin machte die Verfügbarkeit molekularbiologischer Werkzeuge wie Plasmide mit starken Promotoren oder Signalpeptidbibliotheken diesen Stamm zu einem Plattformorganismus für die sekretorische Proteinproduktion.

Corynebacterium glutamicum

Corynebacterium glutamicum (grch.: *coryne* = Keule) ist ein Gram-positives, nicht-pathogenes (GRAS) Bodenbakterium der Klasse der Actinobacteria mit vergleichsweise hohem GC-Gehalt (56%). Durch einen besonderen Zellwandaufbau, z.B. mit langkettigen Mycolsäuren ist das Bakterium stabiler als andere Gram-positive Bakterien gegenüber extremen Umwelteinflüssen (Brennan and Nikaido 1995). Der Organismus wird seit seiner Entdeckung 1957 in der Lebensmittel- und Futtermittelindustrie als Produktionswirt für die Aminosäuren Glutamat und Lysin verwendet (Hermann 2003), dient aber auch zur Herstellung von z.B. Vitaminen (Eggeling and Bott. 2005).

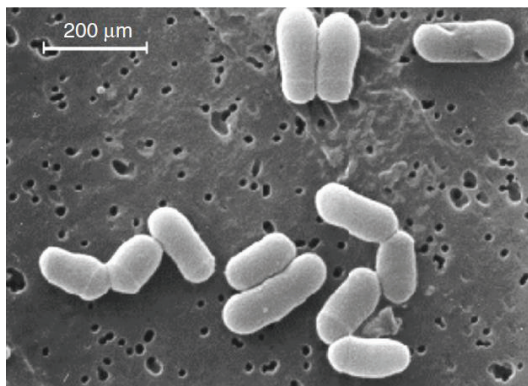


Abbildung 3.3: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *C. glutamicum*-Zellen (Eggeling and Bott. 2005).

Seit etwa 20 Jahren wird *C. glutamicum* ebenfalls zur Herstellung rekombinanter Proteine erforscht, was anhand einiger Beispiele wie der α -Amylase (Billman-Jacobe et al. 1995) oder dem *human epidermal growth factor* hEGF (Date et al. 2006) publiziert wurde. Obwohl nur acht wirtseigener Proteine sekretiert werden, sind die notwendigen Mechanismen sowohl für den SEC-Weg als auch den TAT-Weg vorhanden. Da von *C. glutamicum* nur 3 wirtseigene Proteasen sekretiert werden, ist bisher eine Proteolyse der Zielproteine im umgebenden Medium nur in geringem Maße beobachtet worden (Billman-Jacobe et al. 1995; Date et al. 2006; Watanabe et al. 2009). Daneben machen gut erforschte physiologische Phänomene und etablierte Bioprozesse *C. glutamicum* zu einem attraktiven Wirtsorganismus für die Produktion rekombinanter Proteine. So bietet seit einigen Jahren der japanische Aminosäurehersteller AJINOMOTO optimierte Plasmide und *C. glutamicum*-Stämme für die Sekretion rekombinanter Proteine unter dem Namen CorynExTM an (Teramoto et al. 2011).

3.2 BIOPROZESSKINETIK

Die mikrobielle Produktion biotechnologischer Produkte erfolgt in der Regel in Bioreaktorkultivierungen, in denen Mikroorganismen die benötigten Nährstoffe in gelöster Form zur Verfügung stehen. Die Aufnahme und Verwertung dieser Substrate beeinflusst direkt die Wachstums- und Produktbildungskinetik der Mikroorganismen und lässt sich technisch verhältnismäßig einfach durch einen kontrollierten Nährstoffzulauf steuern. Anhand dieser Substratzufuhr werden in der Bioverfahrenstechnik das Satzverfahren (auch: Batch-Verfahren), das Zulaufverfahren (auch: Fed-Batch-Verfahren) und die kontinuierliche Kultivierung voneinander unterschieden. Da bei einer Satzkultivierung alle Nährstoffe von Beginn an im Medium vorhanden sind, zeichnet sich dieses Verfahren durch eine einfache Durchführung mit einem geringen technischen Aufwand aus. Durch die anfänglich hohe Substratkonzentration kann es aber zur Bildung toxischer Nebenprodukte kommen (Riesenberg 1991), wodurch hierbei selten hohe Zellkonzentrationen und hohe Raum-Zeit-Ausbeuten erreicht werden. Daher werden in industriellen Verfahren zur Herstellung von z.B. rekombinanten Proteinen meist Fed-Batch-Verfahren verwendet, um durch einen kontrollierten Substratzulauf höhere Produktkonzentrationen und damit wirtschaftliche Ausbeuten zu erlangen. Bei kontinuierlichen Kultivierungen wird nicht nur Substrat zugegeben, sondern auch Zellsuspension entnommen. Durch diesen ständigen Zellaustrag lassen sich solche Produktionsverfahren über Wochen bis Monate durchführen, was auf solche lange Sicht zu hohen Raum-Zeit-Ausbeuten führt. Dieses Verfahren wird zur Herstellung rekombinanter Proteine aber selten angewendet, u.a. wegen der möglichen genetischen Instabilität von rekombinanten Produktionsorganismen. Im Folgenden wird daher die mikrobielle Kinetik des Satzverfahrens und des Zulaufverfahrens erläutert.

3.2.1 Satzverfahren (Batch-Verfahren)

Bei der Kultivierung im Satzverfahren (engl.: Batch-Verfahren) wird nach dem Animpfen mit Mikroorganismen kein weiteres Substrat mehr zugegeben. Das Volumen bleibt also weitestgehend konstant, die Substrat-, Biomasse- und Metabolitkonzentrationen ändern sich jedoch ständig (s. Abbildung 3.4). Durch diese Änderungen lassen sich vier charakteristische Kultivierungsphasen voneinander abgrenzen: Die Lag-Phase, die exponentielle Phase, die Stationärphase und die Absterbephase.

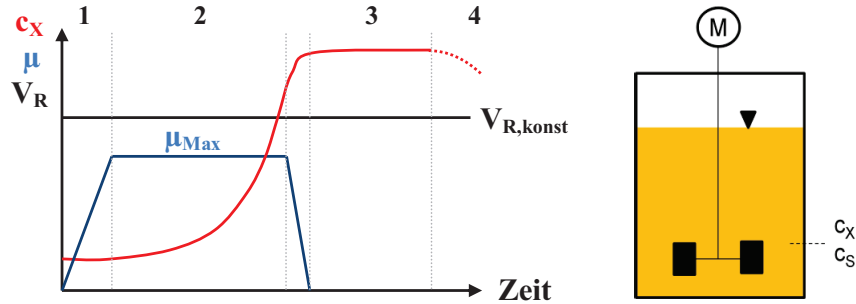


Abbildung 3.4: Kultivierung im Satzverfahren (Batch). Links: Typischer Verlauf einer Batch-Kultivierung. 1: lag-Phase, 2: exponentielle Phase, 3: Stationärphase, 4: Absterbephase. Der Übergang zwischen Phase 2 und 3 wird transiente Phase genannt. Rechts: Schematische Darstellung des Batch-Reaktors. c_X : Biomassekonzentration, c_S : Substratkonzentration, V_R : Flüssigvolumen im Reaktor.

In der lag-Phase passen sich die Zellen ihre Physiologie an das neue Milieu nach dem Animpfen an und erhöhen ihre Wachstumsrate auf einen Maximalwert (Abbildung 3.4, μ_{Max}). Ist dieser Wert erreicht, wachsen die Zellen unlimitiert, solange Substrat im Überschuss vorhanden ist. Diese Phase lässt sich anhand des exponentiellen Wachstumsmodells von Malthus (1798) beschreiben. Die spezifische Wachstumsrate μ ist konstant beim Maximalwert μ_{max} und die Wachstumsrate $r_X = \frac{dc_X}{dt}$ nur von der Biomasse c_X abhängig.

$$r_X = \frac{dc_X}{dt} = \mu_{Max} \cdot c_X \quad \text{Formel 1}$$

Für die Biomasse ergibt sich durch Integration der Differentialgleichung folgender Ausdruck in Abhängigkeit der Zeit:

Mit $t_0 = 0$:

$$c_X(t_1) = c_X(0) \cdot e^{\mu_{max} \cdot t_1} \quad \text{Formel 2}$$

Die spezifische, maximale Wachstumsrate μ_{max} ist ein für die Bioprozessauslegung wichtiges Kriterium. Der hier beschriebene Ausdruck von c_X und μ_{max} dient häufig zur Abschätzung von μ_{max} in Batchkultivierungen.

3.2.2 Zulaufverfahren (Fed-batch-Verfahren)

Wird während der Kultivierung eine Substratlösung zugegeben, spricht man von einem Zulaufverfahren (engl.: Fed-Batch Verfahren). Durch den stetigen Verbrauch zugeführter Nährstoffe ergeben sich in der Regel nur niedrige Substratkonzentrationen im Bioreaktor, womit metabolische Überschussreaktionen, wie sie im Batch-Verfahren auftreten, minimiert werden. So lässt sich in der Regel im Fed-Batch-Verfahren mehr Substrat in Biomasse, bzw. zum gewünschten Produkt umsetzen. Die Endkonzentration und die Raum-Zeit-Ausbeute sind entsprechend höher im Vergleich zum Batch-Verfahren. Unter anderem ist aus diesem Grund in der biopharmazeutischen Industrie das Fed-Batch Verfahren zur Produktion rekombinanter Proteine stark verbreitet (Balbas 2001).

Es sind verschiedene Fed-Batch Strategien beschrieben, die sich nach der Art und Weise einteilen lassen, wie die Substratlösung zugegeben wird (Shimizu 1996; Yee and Blanch 1992). Eine erste, grobe Unterscheidung erfolgt zwischen geregelten und gesteuerten Verfahren. Bei geregelten Verfahren ist eine Messgröße im Bioreaktor (z.B. der Sauerstoffpartialdruck pO_2) über eine Rückkopplungsschleife mit der Feed-Pumpe verbunden, wodurch sich die Pumprate und damit das Feedprofil dem Zustand der Kultivierung im Bioreaktor anpasst (Jenzsch et al. 2006). Diese Vorgehensweise kann durch die PAT-Initiative (*Process-Analytical-Technology*) der amerikanischen *Food and Drug Administration* (FDA) inzwischen auch bei der Produktion von Biopharmazeutika angewendet werden (Rathore et al. 2010).

Bei gesteuerten Verfahren hingegen wird das Feedprofil vor dem Prozesses anhand bekannter Kenngrößen der Bioprozesskinetik (μ_{max} , $Y_{X/S}$, ...) definiert und ohne analytische Messung des metabolischen Zustandes der Kultivierung durchlaufen. Bei hinreichender Information über die Kenngrößen lässt sich das gesteuerte Feedprofil parametrieren, die Pumprate entsprechend programmieren und auch in verschiedene Maßstäbe skalieren. Weicht die Bioprozesskinetik jedoch vom modellierten Verhalten ab, so kann es zu nicht vorhersehbaren Abweichungen von Produktausbeute und Qualität kommen. Vor der PAT-Initiative wurden in der Herstellung von proteinbasierter Biopharmazeutika fast ausschließlich gesteuerte Verfahren angewendet, die auch bis heute ein wichtiges Werkzeug in der Proteinproduktion sind. Eine weitere Einteilung der gesteuerten Fed-Batch Verfahren kann anhand der Pumprate erfolgen, die entweder konstant bleibt oder aber dem mikrobiellen Wachstum entsprechend exponentiell ansteigt (Yee and Blanch 1992). Beide Vorgehensweisen sind in der folgenden Abbildung 3.5 schematisch dargestellt.

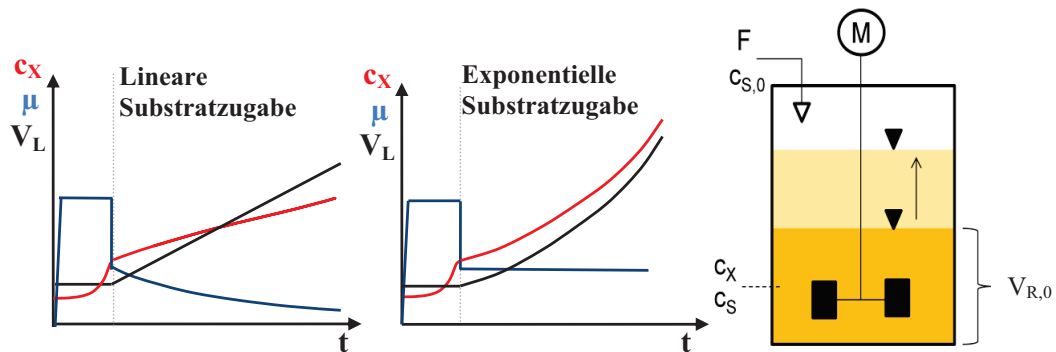


Abbildung 3.5: Typische Kultivierungen im Zulaufverfahren (Fed-batch): Links: mit linearer Substratzugabe, Mitte: mit exponentieller Substratzugabe jeweils nach einer anfänglichen Batchphase. Rechts: Schematische Darstellung eines Fed-Batch-Reaktors.

Bioprozesskinetik bei linearer Substratzugabe

Wenn man annimmt, dass die Zellen asynchron wachsen, der Zellmetabolismus nicht direkt von dem Alter der Kultivierung abhängt und dass der Erhaltungsstoffwechsel vernachlässigt werden kann, lässt sich die Wachstumsrate μ während eines linearen Fed-Batch-Profiles nach Jones and Anthony (1977) bestimmen.

$$\mu = \frac{F}{K_v + F \cdot t} \quad \text{Formel 3}$$

Mit:

$K_v = \frac{V_{L,0} \cdot c_{X,0}}{c_{S,F} \cdot Y_{X/S}}$	[L]	Volumenkonstante nach Jones and Anthony (1977)
$Y_{X/S}$	[g _{BTM} ·g _{Glc} ⁻¹]	Ausbeutekoeffizient
$c_{S,F}$	[g·L ⁻¹]	Substratkonzentration im Feed
$c_{X,0}$	[g·L ⁻¹]	Zellkonzentration bei t = 0
t	[h]	Zeit
$F = \frac{dV_L}{dt}$	[L·h ⁻¹]	Feedrate

Für niedrige und mittlere Zelldichten kann der Erhaltungsstoffwechsel vernachlässigt werden, woraus sich ein linearer Anstieg der Biomasse ergibt:

$$c_X(t) = X_0 + K_v \cdot F \cdot t \quad \text{Formel 4}$$

Weiterhin wird angenommen, dass die Flüssigkeitsvolumen-Zunahme im Reaktor dem Volumen der zugegebenen Flüssigkeit entspricht, die Volumenkontraktion also ebenfalls vernachlässigbar ist. Analog gilt für die Volumenzunahme:

$$V_L(t) = V_{L,0} + F \cdot t \quad \text{Formel 5}$$

Der Vorteil dieser Art der Prozessführung ist die einfache Einstellung der konstanten Feedrate F ohne weitere Ansteuerung der Pumpe über ein Prozessleitsystem. Der Nachteil ist jedoch die über den Prozessverlauf abnehmende spezifische Wachstumsrate μ einhergehend mit ggf. unzureichender Raum-Zeit-Ausbeute. Bei Hochzelldichtefermentationen (HCDC) kann darüber hinaus der Erhaltungsstoffwechsel nicht mehr vernachlässigt werden. So würde bei konstanter Feedrate die Biomassezunahme immer weiter abgeschwächt werden, bis alles zugeführte Substrat für den Erhaltungsstoffwechsel verbraucht würde. Eine Berücksichtigung solcher Faktoren ist mit der exponentiellen Substratzugabe möglich.

Bioprozesskinetik bei exponentieller Substratzugabe

Eine gesteigerte Raum-Zeit-Ausbeute und höhere Zelldichten werden durch Feedprofile realisiert, deren Pumprate über den Prozessverlauf dem bakteriellen Wachstum entsprechend exponentiell ansteigt. Hierdurch ist es möglich, eine wählbare spezifische Wachstumsrate μ in der Feedphase konstant zu halten.

Bei exponentiellen, also über die Zeit zunehmendem Zulauf ist auch die Feedrate F abhängig von der Zeit. So wird aus Formel 5:

$$V_L(t) = V_{L,0} + \int F(t) dt \quad \text{Formel 6}$$

Das exponentielle Wachstum, beschrieben für das unlimitierte Wachstum in Formel 1, wird also durch diese verdünnend wirkende Flüssigkeitszugabe abgeschwächt.

$$r_X = \frac{d(V_L \cdot c_X)}{dt} = \mu_{max} \cdot c_X \cdot V_R \quad \text{Formel 7}$$

Mit folgendem Ausdruck

$$\frac{dV_L}{dt} = F(t) \quad \text{Formel 8}$$

ergibt sich:

$$\frac{dc_X}{dt} = \mu \cdot \left(c_X - \frac{F_0}{V_L} \right) \quad \text{Formel 9}$$

Die Bilanzierung von Substratverbrauch und Substratzugabe ergibt die Änderung der Substratkonzentration im Reaktor. Diese Größe ist wie auch schon die Biomassezunahme von dem Verdünnungseffekt durch zugegebenes Volumen abhängig.

$$\frac{d(c_S \cdot V_L)}{dt} = \underbrace{F_0 \cdot c_{S,0}}_{\text{Zugabe}} - \underbrace{\frac{\mu \cdot c_X \cdot V_L}{Y_{X/S}}}_{\text{Verbrauch}} \quad \text{Formel 10}$$

Mit $\frac{dV_L}{dt} = F_0$ ergibt sich

$$\frac{dc_S}{dt} = \frac{F_0}{V_L} \cdot (c_{S,0} - c_S) - \frac{\mu \cdot c_X}{Y_{X/S}} \quad \text{Formel 11}$$

In Hochzelldichtekultivierungen werden in der Regel Sauerstofflimitierung und Nebenproduktbildung durch eine Wachstumsrate $\mu < \mu_{\max}$ unterbunden. Zugeführtes Substrat wird sofort verbraucht und es kann angenommen werden, dass die Substratkonzentration c_S zu jeder Zeit annähernd null ist und sich während des Prozesses auch nicht ändert.

$$\frac{F_0}{V_L} \cdot c_{S,0} = \frac{\mu}{Y_{X/S}} \cdot c_X \quad \text{Formel 12}$$

Bei $\mu \ll \mu_{\max}$ und bei hohen Zelldichten muss der Erhaltungsstoffwechsel in Form des Maintenance-Koeffizienten m_E berücksichtigt werden. Hierbei wird zwischen dem „messbaren“ Ausbeutekoeffizienten $Y_{X/S}$ und dem „wahren“ Ausbeutekoeffizienten $Y'_{X/S}$ unterschieden. $Y'_{X/S}$ be-

schreibt wie auch $Y_{X/S}$ den Glucoseverbrauch pro Biomasse, aber abzüglich des Glucoseverbrauchs durch den Erhaltungsstoffwechsel.

$$Y_{X/S} = \frac{\mu \cdot Y'_{X/S}}{\mu + Y'_{X/S} \cdot m_E} \quad \text{Formel 13}$$

Mit $Y'_{X/S}$ [g_{Glc} g_{BTM}]
 m_E [g_{Glc} g_{BTM}⁻¹h⁻¹]
 wahrer Ausbeutekoeffizient
 Maintenance-Koeffizient

Aus Formel 12 ergibt sich unter Berücksichtigung des Erhaltungsstoffwechsels:

$$\frac{F_0}{V_L} \cdot c_{S,0} = \left(\frac{\mu}{Y'_{X/S}} + m_E \right) \cdot c_X \quad \text{Formel 14}$$

Wird in Formel 14 der Ausdruck für exponentielles Wachstum (Formel 2) eingesetzt verwendet, so ergibt sich:

$$F_0(t) = \frac{\mu_{set} \cdot V_{L,0} \cdot c_{X,0}}{(Y_{X/S} + m_E) \cdot c_{S,0}} \cdot e^{(\mu_{set} \cdot t)} \quad \text{Formel 15}$$

Mit dieser Gleichung lässt sich anhand der Feedrate F_0 eine konstante spezifische Wachstumsrate μ_{set} einstellen.

Ist das Zielprodukt der Kultivierung nicht Biomasse als solche sondern z.B. ein Protein, eine niedermolekulare Substanz, oder ein Polysaccharid, so dient die Produktbildungskinetik der genaueren Auslegung des Bioprozesses.

3.2.3 Produktbildung

Die Kinetik einer Produktbildung hängt stark von deren ursprünglichen physiologischen Bedeutung in der Zelle ab und lässt sich verallgemeinert nach Luedeking und Piret (1959) in Abhängigkeit der Biomasse sowie deren Wachstum beschreiben.

$$r_P = \frac{dc_P}{dt} = A_P \cdot c_X + B_P \cdot \frac{dc_X}{dt} \quad \text{Formel 16}$$

Bzw. biomassespezifisch: $q_P = A_P + B_P \cdot \mu$

Es wird generell zwischen drei Produktbildungstypen unterschieden. Ist das Produkt und damit die Produktbildungsgeschwindigkeit r_P direkt für das Überleben der Zelle notwendig (wie z.B. Primärstoffwechselprodukte), so ist diese proportional zum Biomassewachstum mit $A_P = 0$ und $B_P > 0$. Findet eine Produktbildung nur in nicht-wachsenden Zellen statt, so ist $A_P > 0$ und $B_P = 0$ (z.B. bei vielen Sekundärmetaboliten). Eine dritte Möglichkeit ist eine Mischform, mit $A_P > 0$ und $B_P > 0$.

Die Bildung intrazellulärer rekombinanter Proteine erfolgt in der Regel strikt wachstumsgekoppelt. Bedingt durch Unterschiede in der Nukleotid- bzw. der Aminosäuresequenz lassen sich aber die Kinetiken der einzelnen Biosyntheseschritte nur schwer vorhersagen (Arnold et al. 2001). Weitere post-translationale Schritte wie z.B. die Proteinsekretion erschweren darüber hinaus noch die Modellierung der Proteinproduktion (Maurer et al. 2006).

3.3 SAUERSTOFFEINTRAG IN BIOREAKTOREN

Mikroorganismen benötigen in aerober Kultivierung neben Energie- und Kohlenstoffquellen auch Sauerstoff, um diese Nährstoffe zu Biomasse und (Neben-) Produkten zu verwerten. Ist nicht ausreichend Sauerstoff verfügbar, führt dies bei vielen Mikroorganismen (u.a. auch bei *C. glutamicum*, *E. coli* und *B. subtilis*) zu einer Veränderung des Metabolismus einhergehend z.B. mit der Sekretion organischer Säuren, die das weitere Wachstum inhibieren können. Darüber hinaus kann eine Sauerstofflimitation bei *E. coli* die Aminosäureproduktion und die Plasmidreplikation verlangsamen (Konz et al. 1998). Beide Vorgänge haben einen direkten Einfluss auf die Bildung rekombinanter Proteine, was den Sauerstoffeintrag zu einem wesentlichen Parameter in der Prozessoptimierung der Proteinproduktion macht.

Damit der Sauerstoff von den Zellen aufgenommen und metabolisiert werden kann, muss dieser in dem umgebenden wässrigen Medium gelöst sein. Der Sauerstoffübergang zwischen der Gas- und der Flüssigphase ist bei einem Bioreaktor also ein entscheidender Parameter. Um diese Vorgänge mathematisch zu beschreiben wird häufig das Zweifilm-Modell verwendet (s. Abbildung 3.6). Bei diesem Modell geht man davon aus, dass die Gasphase und die Flüssigphase jeweils homogen durchmischt sind. Bis auf eine dünne Schicht an der Phasengrenzfläche geht man also von keinen weiteren Konzentrationsgradienten aus.

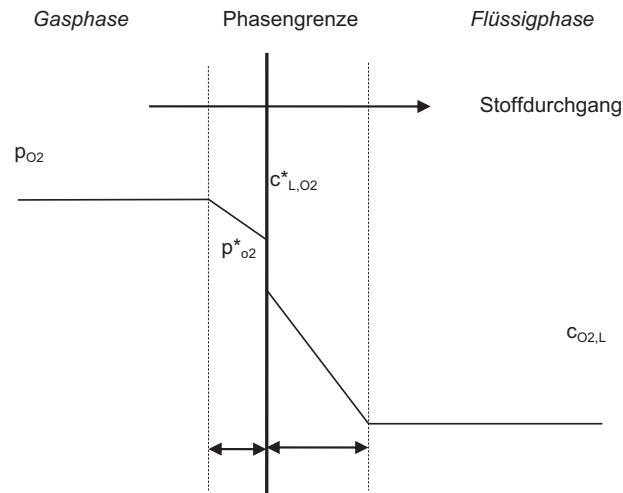


Abbildung 3.6: Zweifilmmodell nach Lewis and Whitman (1924)

An der Phasengrenze wird eine sofortige Einstellung des Phasengleichgewichtes angenommen. Eine weitere Vereinfachung ist die Vernachlässigung des gasseitigen Widerstandes gegenüber dem weitaus größeren flüssigkeitsseitigen Widerstand, wodurch aus dem Zweifilm-Modell das Einfilm-Modell wird. Hierbei entspricht der Sauerstofftransport, der von der Gasphase in die Flüssigphase übergeht, folgendem Ansatz:

$$\frac{dc_{O_2}}{dt} = OTR - OUR = k_L \cdot a \cdot (c_{O_2,L}^* - c_{O_2,L}) - OUR \quad \text{Formel 17}$$

Mit

$$a = \frac{A}{V_L} \quad \text{Formel 18}$$

und

OTR	$[\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}]$	Oxygen Transfer Rate
a	$[\text{m}^{-1}]$	Volumenspezifische Phasengrenzfläche
V_L	$[\text{m}^3]$	Flüssigkeitsvolumen
A	$[\text{m}^2]$	Phasengrenzfläche
k_L	$[\text{m} \cdot \text{h}^{-1}]$	Stoffübergangskoeffizient auf Flüssigkeitsseite
$c_{O_2,L}^*$	$[\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}]$	Sauerstoffsättigungskonzentration in der Flüssigphase
$c_{O_2,L}$	$[\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}]$	Sauerstoffkonzentration der Bulkphase

Die beiden Faktoren k_L und a werden häufig zusammengefasst als $k_L a$ -Wert angegeben, der unabhängig vom Konzentrationsgefälle des Sauerstoffs in der flüssigkeitsseitigen Grenzschicht und damit von c^* ist. Um die Konzentrationsgradienten zu berücksichtigen, wird zur Beschreibung des größtmöglichen Sauerstoffeintrags häufig die maximale *Oxygen Transfer Rate* OTR_{Max} angegeben.

$$OTR_{Max} = k_L \cdot a \cdot c_{O_2,L}^*$$

Formel 19

Die *Oxygen Transfer Rate* (OTR) beschreibt, in welchem Maße der Sauerstoff von einer Gasblase in die Flüssigkeit übergeht, wohingegen die *Oxygen Uptake Rate* (OUR) den Stoffstrom von der Flüssigkeit zum Mikroorganismus beschreibt. Beide Größen nehmen mit zunehmenden Sauerstoffbedarf zu (Abbildung 3.7). Herrscht während einer Kultivierung keine Sauerstofflimitierung, so ist der Bedarf der Zellen gedeckt ($OUR = OTR < OTR_{Max}$, Abbildung 3.7 rechts). Erreicht aber OTR den Maximalwert OTR_{Max} , liegt eine Sauerstofflimitation vor. Dies äußert sich trotz einer Überversorgung an Glucose in einem nichtexponentiellen, meist linearem Wachstumsprofil.

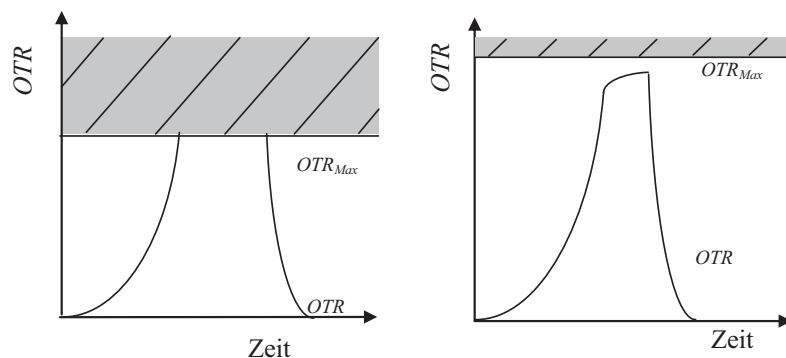


Abbildung 3.7: OTR einer Sauerstoff-limitierten Kultivierung (links) und einer Sauerstoff-unlimitierten Kultivierung (rechts) nach (Anderlei et al. 2004)

Um diese Sauerstofflimitation zu verhindern, lässt sich der $k_L a$ -Wert, bzw. der OTR_{Max} in Rührkesselreaktoren (Stirred Tank Reactor, STR) durch technische Maßnahmen erhöhen, wie z.B. durch die Erhöhung des Sauerstoffpartialdruckes in Gasphase, der Vergrößerung der Phasengrenzfläche, durch größere Turbulenz mittels Strombrechern oder höhere Rührerdrehzahlen.

Der Strömungszustand und damit die Transportkinetik lassen sich mittels empirischer Gleichungen bei genormter Reaktorgeometrie gut abschätzen (Schlüter and Deckwer 1992).

3.3.1 Sauerstoffeintrag in geschüttelten Bioreaktoren

In der frühen Bioprozessentwicklung werden in Laborversuchen meist geschüttelte Reaktionssysteme wie Schüttelkolben oder Mikrotiterplatten verwendet. Bei der Betrachtung von Transportphänomenen sind in diesen Reaktionssystemen zwei generelle Besonderheiten zu beachten: Der Sauerstoff muss erst durch Membranen, Wattestopfen oder Metallkappen von der Umgebung in den Luftraum des Gefäßes gelangen, um dann dort in die Flüssigkeit überzugehen zu können. Für Schüttelkolben mit verschiedenen Abdeckungen konnte aber gezeigt werden, dass nur bei sehr hohen k_La -Werten der Transportwiderstand der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist (Mrotzek et al. 2001). Die zweite Besonderheit des Sauerstoffeintrags in geschüttelte Systeme ist die Begasung über eine einzige Oberfläche und nicht wie in STRs durch viele einzelne Gasblasen bei submerser Begasung. Diese stets zusammenhängende Oberfläche ist in Aufnahmen von gefärbten Flüssigkeiten in geschüttelten MTPs zu erkennen (Abbildung 3.8). Wegen dieser besonderen Begasung ergeben sich nach Maier and Büchs (2001) in MTPs und Schüttelkolben in folgenden Abschnitten beschriebene Parameter, die den OTR_{Max} beeinflussen.

Füllvolumen der Kultursuspension

Mit zunehmenden Füllvolumen steigt zwar die Flüssigkeitssäule in MTPs und Schüttelkolben, die Oberfläche bleibt jedoch (zumindest in zylindrischen MTPs) weitestgehend gleich (s. Abbildung 3.8). Die OTR_{Max} (Formel 17) sinkt also mit zunehmendem Füllvolumen, da die volumenspezifische Phasengrenzfläche a abnimmt. Dieser lineare Zusammenhang wurde von Kensy et al. in 24er MTP (Kensy et al. 2005) und 96er MTP (Kensy et al. 2009a) in einem weiten Volumenbereich experimentell bestätigt. Diese Abhängigkeit lässt sich aber nicht für alle Betriebsweisen übertragen. So kommt es beispielsweise in Schüttelkolben unter bestimmten Betriebszuständen zu einer „aus der Phase“ geratenen Durchmischung, bei der die Flüssigkeit vom Schüttelkolben nicht mitgerissen wird. Daher findet unter bestimmten Bedingungen ein Einbruch des Leistungseintrages (Büchs et al. 2001) und damit des Stofftransports statt. Für dieses Phänomen wurde die dimensionslose Kenngröße der *Phase-Number* P_h eingeführt, die einen kritischen Wert überschreitet, wenn die Fluidodynamik „aus der Phase“ schwingt (Büchs et al. 2001).

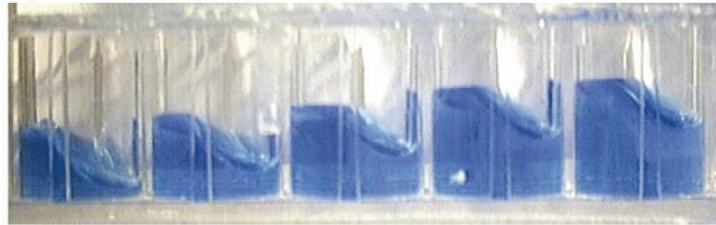


Abbildung 3.8: Flüssigkeitsprofil in einer geschüttelten Mikrotiterplatte: 96er MTP, Schüttelfrequenz: 300 min^{-1} , Exzentrizität: 50 mm mit unterschiedlichem Füllvolumen, veröffentlicht von Duetz (2007).

Gefäßgeometrie von geschüttelten Bioreaktoren

Es sind verschiedenste Gefäßarten von MTPs und Schüttelkolben in der allgemeinen Verwendung, von denen einige bezüglich des Sauerstofftransports charakterisiert sind. So führt die Verwendung von Strombrechern (Schikanen) in Schüttelkolben zu mehr Turbulenz in der Flüssigkeit, was den k_{La} -Wert um Faktor 5 bis 10 steigern kann, je nachdem welche Größe und Anordnung die Schikanen haben (Büchs 2001). In MTPs beobachtete Dütz einen ähnlich positiven Effekt bei der Verwendung einer eckigen Wellgeometrie (Duetz 2007) anstelle einer runden. Funke et al. (2009) berücksichtigten darauf aufbauend bei der Auswahl einer praktikablen MTP-Wellgeometrie aus 50 Well-Designs nicht nur die möglichst hohe OTR_{Max} , sondern auch das „Spilling Over“, also das Überschwappen bei hohen Schüttelfrequenzen. Ein Kompromiss zwischen OTR_{Max} und dem hoch geschleuderten Flüssigkeitspegel ist die heute kommerziell erhältliche Flowerplate, die eine Well-Geometrie mit 6 Einkerbungen in Form einer Blumenstruktur besitzt.

Schüttelfrequenz

Eine hohe Schüttelfrequenz bedeutet sowohl in Schüttelkolben als auch in MTP eine vermehrte Turbulenz und damit einen höheren Sauerstoffeintrag (Duetz 2007). Erhöht man aber die Schüttelfrequenz, so erhöht sich gleichzeitig auch die Gefahr des „Spilling Over“ (vorheriger Abschnitt). Ebenso erhöht sich in Schüttelkolben mit zunehmender Schüttelfrequenz die in Abschnitt 2 beschriebene Gefahr der „aus der Phase“ geratenen Flüssigkeit.

Exzentrizität

Mit Exzentrizität ist der Ausschwing-Radius eines Schüttel-Tablars gemeint, der ebenfalls einen wesentlichen Einfluss auf den Stofftransport hat. So kann die OTR_{Max} durch eine größere Exzentrizität (50 mm) erhöht werden (Hermann et al., 2003). Durch eine kleine Exzentrizität wird das Spilling-Over vermindert, im Gegenzug muss aber für einen gleichen OTR_{Max} die Schüttelfrequenz erhöht sein (Duetz 2007).

Wie beim STR sind die Transportphänomene anhand empirischer Gleichungen und dimensionsloser Kenngrößen in Abhängigkeit von den technisch einstellbaren Parametern abschätzbar. So stellen Maier und Büchs (2001) eine Proportionalität der OTR_{Max} in 250 mL Schüttelkolben für die oben beschriebenen Parameter auf:

$$OTR_{Max} \sim N^{0.84} \cdot V_L^{-0.84} \cdot d_0^{0.27} \cdot d^{-1.25} \quad \text{Formel 20}$$

mit

N	[min ⁻¹]	Schüttelfrequenz
d_0	[m]	Exzentrizität
d	[m]	Maximaler Flaschendurchmesser

Erhöht man also Schüttelfrequenz und die Exzentrizität, bzw. senkt man das Flüssigkeitsvolumen V_L und den Flaschendurchmesser (bei konstantem Flaschenvolumen), so kann man in Schüttelkolben die OTR_{Max} erhöhen, um eine Sauerstofflimitation zu vermeiden. Mit Hilfe solcher Berechnungen lassen sich verfahrenstechnisch kontrollierte Bedingungen bereits in der frühen Bioprozessentwicklung bewerkstelligen und erleichtern dadurch eine Maßstabsvergrößerung in STRs.

3.4 KRITERIEN ZUR MAßSTABSVERGRÖßERUNG

Prozesse innerhalb eines Bioreaktors sind ein Resultat der Kinetik der Mikroorganismen (Mikrokinetik), der Thermodynamik und des Stofftransports (Mavituna 1996). Während die Mikrokinetik und die Thermodynamik weitestgehend vom Maßstab unabhängig sind, ist der Stofftransport (vgl. vorheriges Kapitel 3.3) stark vom Maßstab abhängig. Um Produkte wie z. B. rekombinante Proteine wirtschaftlich zu produzieren, muss aber das Reaktorvolumen auf ein entsprechend großes Maß übertragen werden. In einer solchen Maßstabsvergrößerung (engl.: Scale-up)

werden die in Modellbioreaktoren ($< 5 \text{ L}$) optimierten Bedingungen, in einen Pilot-Bioreaktor (0.5 m^3 bis 5 m^3) und letztlich in eine Produktionsanlage (häufig $> 5 \text{ m}^3$) übertragen. Der DECHEMA Verband standardisierte 1991 die Geometrie der auch heute weit verbreiteten STR-Bioreaktoren und deren Rührer. So haben Bioreaktoren in den meisten Maßstäben ein Höhe-zu-Durchmesser-Verhältnis von $H/D = 3:1$ für mikrobielle Prozesse bzw. $H/D = 2:1$ für Säugetierzellen (Storhas 1994). Die meisten Berechnungen von Scale-up-Kriterien beruhen auf der Annahme dieser geometrischen Ähnlichkeit.

Ein klassisches Werkzeug in der chemischen Verfahrenstechnik ist die Auslegung der Freiheitsgrade anhand von im kleinen Modellmaßstab ermittelten dimensionslosen Kennzahlen, die dann unabhängig von der Reaktorgröße konstant gehalten werden. Ein bekanntes Beispiel einer solchen Kennzahl ist die Reynolds-Zahl **Re**, die die Turbulenz einer strömenden Flüssigkeit anhand des Verhältnisses zwischen Trägheitskräften und Zähigkeitskräften des Fluids beschreibt (Rushton 1950).

Bei einem Scale-up können aber nicht alle Kennzahlen konstant gehalten werden, was im folgenden *Penney-Diagramm* veranschaulicht ist. So nimmt mit dem Kriterium der gleichen Mischzeit die über den Rührer eines STRs einzubringende Leistung pro Volumeneinheit (P/V , y-Achse) um den Faktor 100 zu, wenn das Volumen von 1 L auf 1000 L erhöht werden soll (x-Achse). Das Kriterium der Mischzeit wird in der chemischen Verfahrenstechnik angewendet, wo es im Gegensatz zur mikrobiellen Kinetik zu sehr schnellen, chemischen Reaktionen kommen kann.

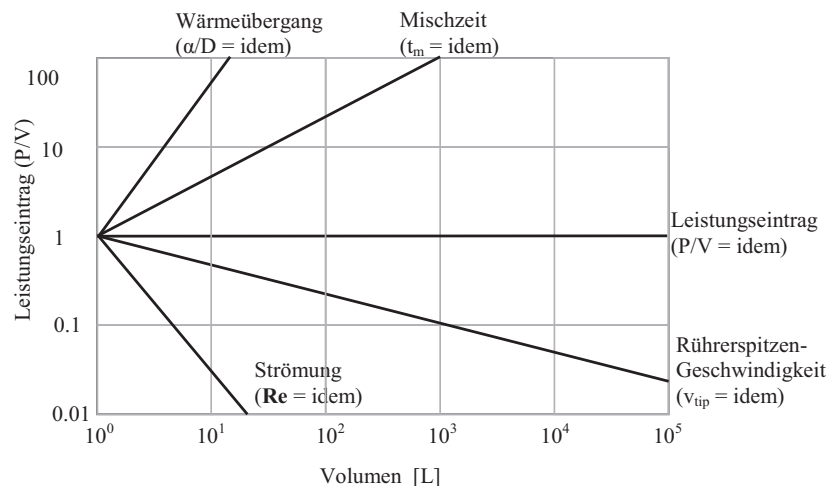


Abbildung 3.9: Penney-Diagramm nach (Coker 2007; Kipke 1985): Veränderung des Leistungseintrags bei einer Maßstabsvergrößerung von Bioreaktoren, während verschiedene Parameter konstant (idem) gehalten werden.

Das Kriterium des konstanten volumetrischen Leistungseintrages P/V wurde in der frühen Bioverfahrenstechnik erfolgreich für z.B. die Auslegung von Antibiotikum-Produktionsanlagen angewendet. Für unbegaste STR lässt sich P/V anhand der Rührerdrehzahl und des Rührer-Durchmessers berechnen:

$$\text{Leistungseintrag} \quad P = N_p \rho N^3 d_i^5 \quad \text{Formel 21}$$

Mit	P	$[\text{kg m}^2 \text{s}^{-3} = \text{W}]$	Rührerleistung
	N	$[\text{s}^{-1}]$	Rührerfrequenz
	N_p	$[-]$	Leistungszahl, rührerspezifisch
	d_i	$[\text{m}]$	Rührerdurchmesser
	ρ	$[\text{kg m}^{-3}]$	Dichte

Im begasten Zustand ist dieser Wert um 30% bis 40% kleiner. Wird P/V bei einer Maßstabsvergrößerung konstant gehalten, führt dies zwar zu einer gleich beschaffenen Begasung in allen Maßstäben, aber nicht immer zu einem gleichen Sauerstoffeintrag $k_L a$. Ein konstanter Sauerstoffeintrag ($k_L a$, oder OTR_{Max}) wird in der industriellen Biotechnologie vor allem für aerobe Kultivierungen verwendet, wie z. B. bei der Herstellung rekombinanter Proteine mit *E. coli*. Hierbei werden anhand empirischer Parameter (s. Formel 22) die Freiheitsgrade der Rührerdrehzahl und der Begasungsrate eingestellt (Van't Riet 1979).

$$\text{Sauerstoffübergang} \quad k_L a = c_1 \left(\frac{P}{V} \right)^{c_2} (v_g)^{c_3} \quad \text{Formel 22}$$

Mit	v_g	$[\text{m s}^{-1}]$	Gasleerohrgeschwindigkeit
	c_i	$[-]$	Empirische Koeffizienten

Beispielsweise führte Islam einen Scale-up der rekombinanten Proteinproduktion mit *E. coli* von 5 mL über 7.5 L hin zu 75 L bei zwei konstanten $k_L a$ -Werten durch. Bei dem niedrigen $k_L a$ -Wert konnten die Ergebnisse der kleineren Reaktoren im 75 L Maßstab nicht reproduziert werden (Islam et al. 2007; Islam et al. 2008), bei dem hohen $k_L a$ -Wert schon. Ähnliche maßstabsabhängige Phänomene werden auf Substrat-oder Sauerstoffgradienten durch die inhomogene Durchmischung großer Reaktoren zurückgeführt, die mitunter auch die Proteinproduktion beeinflussen

(Bylund et al. 1999; Korneli et al. 2011). Solche großtechnischen Phänomene lassen sich inzwischen mittels Scale-Down-Reaktoren experimentell auch im kleinen Maßstab simulieren, in dem durch einen Flüssigkeitskreislauf in Zwei-Kompartiment-Reaktoren die Zellen einer zyklischen Über- und Unterversorgung an Nährstoffen ausgesetzt werden (Neubauer et al. 1995). So können Phänomene, die normalerweise erst nach einer Maßstabsvergrößerung in Produktionsanlagen auftreten, bereits in der frühen Bioprozessentwicklung aufgedeckt werden. Gebräuchliche Kenngrößen, die bei einem Scale-up konstant gehalten werden können, sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

Tabelle 3.2: Gebräuchliche Scale-up Kriterien: Kriterien, die während einer Maßstabsvergrößerung (Scale-up) in der chemischen Verfahrenstechnik und der Bioverfahrenstechnik einzeln oder ggf. in Kombination konstant gehalten werden können.

Scaleup-Kriterium			Bemerkungen	Referenz
Wärmeübergang	α/d_R	$\left[\frac{W}{m^3 \cdot K} \right]$	Meist durch externe technische Konzepte gelöst (z.B. Sole als Kühlmittel)	(Cooney 1983)
Leistungseintrag	Formel 21	[W]	Volumetrischer Leistungseintrag P/V des Rührers, häufig angewendetes Kriterium für mikrobielles Wachstum	(Rushton 1950)
Mischzeit	$t_m = f(n, d_i, v)$ $P \sim V^{2/3}$	[s]	Kriterium bei schnellen, chemischen Reaktionen, nicht für mikrobielles Wachstum (Ju and Chase 1992).	(Fox and Gex 1956)
Volumetrischer Sauerstoffeintrag	Formel 22	$\left[\frac{1}{s} \right]$		(Van't Riet 1979)
Rührerspitzen-Geschwindigkeit	$v_{tip} = 2\pi \cdot N \cdot d_i$	$\left[\frac{m}{s} \right]$	Kriterium für schersensitive Prozesse, z.B. die Kultivierung von Pilzen oder Säugertierzellen	(Chisti 1993)
Strömungszustand am Rührer (Reynoldszahl)	$Re = \frac{\rho}{\eta} \cdot d \cdot v$	[1]	Für Kultivierungen meist ungeeignet (Ju and Chase 1992), da die Sauerstoffversorgung nicht ausreicht.	(Rushton 1950)
Volumenspezifische Begasungsrate	$VVM = \frac{\dot{V}}{V_L}$	$\left[\frac{1}{min} \right]$	Zwei verschiedene Parameter der Begasungsrate	(Ju and Chase 1992)
Gasleerrohr-Geschwindigkeit	$v_s = \frac{\dot{V}}{A_R}$	$\left[\frac{m}{min} \right]$		

Abkürzungen: d_R = Durchmesser des Reaktorraumes, N_{p0} = Rührer-spezifische Leistungsnummer, n = Rührerdrehzahl, d_i = Rührer-Durchmesser, v_g = Gasleerrohrgeschwindigkeit, V_L = Flüssigkeitsvolumen, ρ = Dichte, η = Viskosität, Re = Reynoldszahl.

Die Maximalwerte der einstellbaren Prozessparameter sind durch technische Rahmenbedingungen beschränkt. So könnte bis in den Produktionsmaßstab $> 5 \text{ m}^3$ die volumetrische Begasung (VVM, Tabelle 3.2, Punkt 7) nicht gleichgehalten werden, da es sonst bei höheren Viskositäten, wie sie in Hochzelldichte-Kultivierungen auftreten, zu einer Förderung, also einem Austrag der Flüssigkeitssäule durch zu hohe Begasungsraten kommen könnte. Daneben gibt es je nach Mikroorganismus auch biologische Grenzen und Rahmenbedingungen. So erhöht sich bei gleichem Leistungseintrag die Geschwindigkeit der Rührerspitzen (s. Tabelle 3.2, Punkt 5), was sich durch deren Scherkräfte negativ auf Organismen wie filamentöse Pilze oder Säugetierzellen auswirken kann.

Eine weitere Strategie der Maßstabsvergrößerung in den Pilotmaßstab kann mittels Regelungstechnik erfolgen, um eine ausreichende Sauerstoffversorgung zu sichern. Hierbei werden die Rührerdrehzahl, die Begasungsrate und der Überdruck im Kopfraum durch den im Reaktor gemessenen Sauerstoffpartialdruck über einem kritischen Wert gehalten (Riesenberg et al. 1990). Diese Strategie ist wegen der inhomogenen Durchmischung in größeren Reaktoren ($> 5 \text{ m}^3$) nur bedingt anwendbar.

3.4.1 Maßstabsvergrößerung aus geschüttelten Mikrobioreaktoren

In der frühen Bioprozessentwicklung wird die Optimierung von Stämmen und Kultivierungsbedingungen meist in geschüttelten Reaktionsgefäßen, wie Schüttelkolben oder Mikrotiterplatten durchgeführt. Der Experimentator kann durch die einfache Handhabung in kurzer Zeit viele Experimente untersuchen, erhält aber im Vergleich zu Kultivierungen im Bioreaktor kaum Informationen über wichtige prozesstechnische Parameter des Strömungszustands und Stofftransports.

Seit ca. 10 Jahren gibt es aber erfolgreiche Bestrebungen, das Reaktorkonzept des STR zu miniaturisieren. So konnten beispielsweise 48 miniaturisierte, gerührte Bioreaktoren parallelisiert zur Bioprozessentwicklung eingesetzt und die Prozesse mit bekannten Berechnungsverfahren auf herkömmliche Bioreaktoren übertragen werden (Knorr et al. 2007; Puskeiler et al. 2005b). Der technische Aufwand ist für Laborarbeiten in der frühen Entwicklungsphase jedoch sehr hoch, weswegen viele Arbeitsgruppen nach wie vor auf geschüttelte Systeme wie Schüttelkolben oder MTP zurückgreifen. Viele dieser geschüttelten Systeme sind heute bezüglich der Transportphänomene charakterisiert, wie anhand des Sauerstoffeintrags auf Seite 25 bis 26 dargestellt wurde. So kann eine Maßstabsübertragung anhand klassischer Scale-up Kriterien wie dem k_{La} oder der OTR_{Max} erfolgen (Marques et al. 2010).

Ein Ansatz zur Berechnung des $k_L a$ in MTPs wurde von (Doig et al. 2005) mittels dimensionsloser Kennzahlen eindrucksvoll erarbeitet. Die Autoren verwendeten eine in der Verfahrenstechnik verbreitete empirische Vorgehensweise zur Berechnung des Stoffübergangskoeffizienten k_L (erster Koeffizient im $k_L a$ -Term) in Abhängigkeit der Turbulenz (**Re**) und der physikochemische Eigenschaften der Flüssigkeit (**Sc**) mit folgendem Ansatz.

$$\mathbf{Sh} = b \cdot \mathbf{Re}^c \cdot \mathbf{Sc}^d \quad \text{Formel 23}$$

mit

Re	[-]	Reynoldszahl:	Turbulenz $\sim \frac{\text{Tragheitskräfte}}{\text{Zähigkeitskräfte}}$
Sc	[-]	Schmidtzahl:	Stofftransport $\sim \frac{\text{Impulstransfer}}{\text{Massentransfer}}$
Sh	[-]	Sherwoodzahl:	Effektiver Stoffübergang $\sim \frac{\text{Konvektion}}{\text{Diffusion}}$
b,c,d	[-]	Empirische Parameter	

Die empirischen Parameter und damit auch k_L waren für 24er, 96er oder 384er MTP gleich. Die spezifische Oberfläche a (zweiter Koeffizient im $k_L a$ -Term) wurde mit einem Ansatz über die Froude und Bond-Zahl angegeben und erwies sich als abhängig von der Plattengeometrie.

$$a_f = a_i \cdot 165 \cdot d_v \cdot \mathbf{Fr}^x \cdot \mathbf{Bo}^y \quad \text{Formel 24}$$

mit

Fr	[-]	Froudezahl:	Turbulenz $\sim \frac{\text{Tragheitskräfte}}{\text{Zähigkeitskräfte}}$
Bo	[-]	Bondzahl:	Stofftransport $\sim \frac{\text{Impulstransfer}}{\text{Massentransfer}}$
a_f	[m ⁻¹]	volumetrische Phasengrenzfläche, geschüttelter Zustand	
a_i	[m ⁻¹]	volumetrische Phasengrenzfläche, ungeschüttelter Zustand	
x, y	[-]	Empirische Parameter	

Aus Formel 23 und Formel 24 ergibt sich:

$$k_L a = 31.35 \cdot D \cdot a_i \cdot \mathbf{Re}^{0.68} \cdot \mathbf{Sc}^{0.36} \cdot \mathbf{Fr}^x \cdot \mathbf{Bo}^y \quad \text{Formel 25}$$

mit

D	[m ² s ⁻¹]	Diffusionskoeffizient
-----	-----------------------------------	-----------------------

Islam et al. (2008) verwendete diese empirische Gleichung für einen erfolgreichen Scale-up der rekombinanten Proteinproduktion mit *E. coli* aus geschüttelten 5 mL Mikrobioreaktoren (μ24, Pall, Port Washington/USA) in 7.5 L und 75 L Bioreaktoren (vgl. auch Kapitel 3.4). Um die einstellbaren Parameter mit dem Sauerstoffeintrag zu korrelieren, wurde der OTR_{Max} mittels Oxidation von Sulfit oder der enzymatischen Oxidation von Glucose bestimmt.

Ein schwierigerer zu messender Parameter ist die eingebrachte Leistung bei geschüttelten Kultivierungen. Durch die Messung des Moments am Antriebsmotor eines Tablars (Büchs et al. 2000) konnten zwar empirische Gleichungen für Schüttelkolbenkultivierungen aufgestellt werden (Büchs et al. 2000). Eine Messung des Leistungseintrages in Mikrotiterplatten ist bis heute aber nicht durchgeführt, da der Leistungsunterschied beim Schütteln zwischen vollen und leeren MTP kaum messbar ist (Marques et al. 2010).

3.5 STATISTISCHE VERSUCHSPLANUNG IN DER BIOPROZESSOPTIMIERUNG

Zur Beschleunigung der Bioprozessoptimierung kann die Anzahl der Versuchspunkte reduziert werden. Um die Reaktionsbedingungen anhand vieler Parameter gleichzeitig zu optimieren, werden durch systematische Versuche in einer „statistischen Versuchsplanung“ optimale Bereiche identifiziert. Ein generelles Vorgehen hierbei gliedert sich in drei Schritte: A) das Aussieben, B) das Eingrenzen und C) die Optimierung (Mandenius and Brundin 2008b; Weuster-Botz 1999).

Aussieben: erstes Screening der Parameter

Beim Aussieben wird meist nur ein einzelner Parameter bei gleichhalten aller anderen Parameter variiert (s. Abbildung 3.10, A). Dieses Vorgehen wird auch *One-Factor-at-a-time* (OFAT)-Analyse genannt und bietet in der Grundlagenforschung eine breite Anwendung. Dieses einfache Vorgehen hat den Vorteil, dass die Versuchszahl nur linear mit der Anzahl zu untersuchender Parameter steigt. Dabei werden aber keine Ergebnisse kombinierter Parametervariationen untersucht, wodurch wichtiger Informationen verloren gehen können.

$$z = \alpha_0 + \alpha_1 X_1 + \alpha_2 X_2 + \alpha_3 X_1 X_2 + \alpha_4 X_1^2 + \alpha_5 X_2^2$$

Formel 26

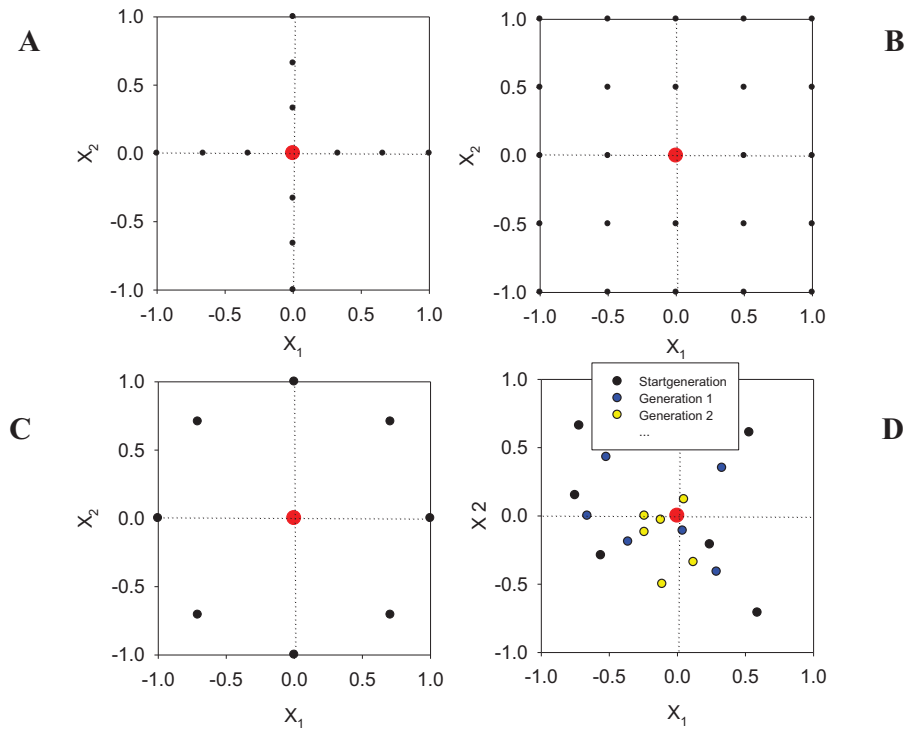


Abbildung 3.10: Strategien bei der Parameteroptimierung. A: One-factor-at-a-time (OFAT); B: Full-factorial design (FFD); C: Central composite design CCD (Mandenius and Brundin 2008a), D: Genetischer Algorithmus, Schema von drei Populationen, die sich dem Optimum annähern.

Eingrenzung der Parameterbereiche

Im „Eingrenzungs“-Schritt werden die in A) „ausgesiebten“ Parameterräume näher untersucht. Hierbei werden mit faktoriellen Versuchsplänen detailliertere Abstufungen und Parameterkombinationen untersucht. Der sogenannte *vollfaktorielle* Versuchsplan ist dabei das informativste, aber auch aufwendigste Vorgehen, bei dem jede Abstufung von Parameter X_1 mit jeder Abstufung von Parameter X_2 kombiniert wird (s. Abbildung 3.10, B). Möchte man z.B. 5 Parameter-Abstufungen von n Parametern untersuchen ergeben sich hierbei 5^n Versuche. Mit zunehmender Zahl an zu untersuchenden Parametern steigt die Anzahl der Versuche also exponentiell an, was bei steigender Parameterzahl zu einer „kombinatorischen Explosion“ führt.

Optimierung

Im dritten Schritt werden die Bereiche mit vermuteten Optima genauer untersucht und mittels quadratischer Modelle (Response Surface, als Beispiel mit zwei Parametern s. Formel 26) ausgewertet. Eine Reduktion der Versuchsanzahl erfolgt hier durch die gleichzeitige Veränderung mehrerer Parameter (hier: X_1 und X_2), um so den Einfluss einzelner Parameter anhand der empirischen Koeffizienten α_1 , α_2 , deren Kombinationen (α_3) und das nicht lineare Verhalten (α_4 , α_5) zu beschreiben. Es gibt eine Vielzahl von diesen *Experimental Designs*, das Central-Composite-Design (CCD) ist exemplarisch in Abbildung 3.10 C dargestellt.

Eine vollständige Durchführung eines solchen dreigliedrigen Vorgehens ist zwar in der industriellen Qualitätssicherung von z.B. Fertigungsprozessen weitreichend etabliert (Juran 1967), in der Optimierung von Fermentationsmedien aber selten beschrieben. Bei publizierten Arbeiten wird das Eingrenzen, also der Schritt B meist ausgelassen und nicht selten bei Schritt A auf Literaturdaten zurückgegriffen.

Neben der statistischen Versuchsplanung ist der genetische Algorithmus (GA) eine in den 90er Jahren entwickelte und heute etablierte Vorgehensweise zur Bioprozessoptimierung (Franco-Lara et al. 2006; Freyer 1992; Link and Weuster-Botz 2006; Weuster-Botz 2000). Bei diesem Vorgehen bediente man sich bei evolutiven Konzepten und Begriffen. Es wird in einer ersten Versuchsreihe die „Fitness“ einer Parameter-„Population“ experimentell untersucht. Durch „Rekombination“ und „Selektion“ der Parameter werden Versuchsreihen einer neuen „Generation“ für anschließende Versuche generiert, um sich nach und nach dem Optimum anzunähern. Diese verhältnismäßig schnelle Art der Bioprozessoptimierung findet meist wegen einer verteilten Startpopulation tatsächlich ein praktikables, aber nur selten das globale Optimum.

Welche Vorgehensweise besser geeignet ist, hängt von den Vorkenntnissen des Bioprozesses, von der Anzahl der Parameter und von den experimentellen Umständen ab (Weuster-Botz 2000). Können beispielsweise bei jeder MTP-Kultivierung 96 Ansätze kultiviert werden, wohingegen der genetische Algorithmus aber weniger notwendige Versuchspunkte vorschlägt, wird das volle Potential der parallelen Kultivierung nicht ausgenutzt. Auch ist die Hürde von einfach ersichtlichen OFAT/vollfaktoriellen Plänen hin zu intuitiv schlecht zugänglichen, statistischen Versuchsplänen ein Hindernis für viele Experimentatoren. Einige der Quality-by-Design-Richtlinien der U.S. Food and Drug Administration (FDA 2007) regeln inzwischen die Qualitätssicherung biopharmazeutischer Produkte mit Vorgaben zu ähnlich systematischen Vorgehensweisen wie oben beschrieben (Yu 2008).

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1 STÄMME

Zur Herstellung kompetenter Zellen wird *E. coli* BL21 in mit Mg^{2+} -Ionen versetztem LB-Medium kultiviert, bei $OD_{600} = 0.5-0.7$ geerntet und bei $4^{\circ}C$ mit $4000\ g$ für $15\ min$ zentrifugiert. Das Zellpellet wird in $50\ mL$ eiskaltem TMF-Puffer ($100\ mM\ CaCl_2$; $50\ mM\ RbCl_2$; $40\ mM\ MnCl_2$) vorsichtig resuspendiert, $1\ h$ auf Eis gelagert, erneut zentrifugiert und in $4\ mL$ TMF-Puffer resuspendiert. Zur Kryokonservierung werden die kompetenten Zellen mit $1\ mL$ Glycerin versetzt und je $200\ \mu L$ Zellsuspension aliquotiert.

C. glutamicum ATCC 13032 wird in BHI bis zur späten exponentiellen Phase ($OD_{600} = 4$) angezogen und bei einer Endkonzentration von 33% Glycerin bei $-80^{\circ}C$ gelagert. Einmal aufgetaute Gefrierkulturen werden verworfen. Auf LB oder BHI-Agar angewachsene Kolonien werden nach 5 Tagen Lagerung ($4^{\circ}C$) nicht mehr verwendet.

B. subtilis TEB1030 DB4 30 *lip A lip B* werden aus einer Stammsammlung (Brockmeier et al. 2006a) auf LB-Selektiv-Platten vereinzelt, in LB-Flüssigmedium angezogen und in der späten exponentiellen Phase ($OD_{600} = 3$) in insgesamt 33% Glycerin bei $-80^{\circ}C$ kryokonserviert. Auf LB-Agar angewachsene Kolonien werden nach 2 Tagen Lagerung ($4^{\circ}C$) nicht mehr verwendet.

4.2 PLASMIDE

Tabelle 4.1: Verwendete Plasmide in dieser Arbeit.

Name	Promoter	Induktion	Resistenz	Wirt	Referenz
pEKEX2	tac	IPTG	Kanamycin	<i>E. coli</i> / <i>C. glutamicum</i>	Eikmanns 1991
pXMJ19	tac	IPTG	Chloramphenicol	<i>E. coli</i> / <i>C. glutamicum</i>	Jakoby 1999
pet28a	T7	T7-Polymerase / IPTG	Kanamycin	<i>E. coli</i>	Rosenberg 1987
pBSMul	pHpaII (konstitutiv)	Keine	Kanamycin	<i>E. coli</i> / <i>B. subtilis</i>	Brockmeier 2006

4.3 NÄHRMEDIEN

Die Hauptkulturen der verwendeten Bakterien werden soweit möglich in Minimalmedien kultiviert, die ersten Vorkulturen in Komplexmedien. Soweit es die Stabilität der Bestandteile erlaubt, werden die Medien bei 121°C feuchter Hitze im Autoklaven für 20 min sterilisiert. Hitze-labile Bestandteile werden mit Spitzenaufsatzfiltern ($\varnothing = 0.22 \mu\text{m}$) filtriert. Lösungen werden bei 4°C gelagert.

Tabelle 4.2: Gepuffertes Minimalmedium CG XII für *C. glutamicum* (Keilhauer et al. 1993). Alle Stammlösungen werden in VE-Wasser angesetzt, die Pufferlösung (MOPS, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ wurde mit 4 M NaOH auf pH = 7 eingestellt). Mit einem * markierte Volumina werden als Stammlösungen autoklaviert, alle Weiteren werden sterilfiltriert.

Substanz	Masse pro Liter	V der Stammlsg. [mL L ⁻¹]
Glucose	20 g	50*
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	20 g	940*
Harnstoff	5 g	
KH_2PO_4	1 g	
K_2HPO_4	1 g	
MOPS	42 g	
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.25 g	1*
CaCl_2	10 mg	1*
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10 mg	1
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	10 mg	
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1 mg	
CuSO_4	0.2 mg	
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.02 mg	
Biotin	0.2 mg	1
PCA	7.5 mg	2

Tabelle 4.3: Komplexmedium Brain Heart Infusion BHI (Gies 1919) für *C. glutamicum*. Für Agarplatten werden 10 g L⁻¹ Agaragar vor dem Autoklavieren zugesetzt.

Substanz	Masse pro Liter
BHI	37 g

Tabelle 4.4: Supplementiertes Komplexmedium MVen3 für *B. subtilis*.

Substanz	Masse pro Liter
Trypton	10 g
Hefeextrakt	10 g
NaCl	5 g
Glucose	20 g
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$	3.70 mg
H_3BO_3	24.70 mg
CoCl_2	3.90 mg
CuSO_4	1.60 mg
MnCl_2	10.0 mg
FeCl_3	1.60 mg
Natriumcitrat $2\text{H}_2\text{O}$	100 mg
Natriumglutamat	100 mg

Tabelle 4.5: Minimalmedium nach Wilms-Reuss für *E. coli* (Wilms et al. 2001). Stickstoffquelle, Phosphat und MOPS werden auf pH = 7 eingestellt.

Substanz	Masse pro Liter	V der Stammlsg. [mL·L ⁻¹]
Glucose	20 g	100
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5 g	1
NH_4Cl	0.5 g	
Na_2SO_4	2 g	2
K_2HPO_4	3 g	3
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.50 g	10
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.54 mg	1
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2.00 mg	
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.54 mg	
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.48 mg	
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5.40 mg	
$\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.48 mg	
Titriplex III	330 mg	
Thiamin · HCl	0.01 g	1
MOPS	21 g	200

Tabelle 4.6: **Komplexmedium LB (Bertani 1951).** Für Agarplatten werden 10 gL^{-1} Agaragar vor dem Autoklavieren zugesetzt. Vor dem Autoklavieren wurde auf $\text{pH} = 7.0$ eingestellt. Für die Kultivierung von *C. glutamicum* wird dem LB-Medium 5 gL^{-1} Glucose nach dem Autoklavieren zugesetzt.

Substanz	Masse pro Liter
Trypton	10 g
Hefeextrakt	10 g
NaCl	5 g

4.4 ANALYTIK

4.4.1 Biomassekonzentration

Die Biomassekonzentration wurde in dieser Arbeit anhand I) der optischen Dichte, II) durch Auswiegen von Biotrockenmasse oder III) mittels Backscatter bestimmt.

- I) Die optische Dichte von Bakteriensuspensionen wird bei $\lambda = 600 \text{ nm}$ in Halbmikroküvetten (LLG, Meckenheim/D) in einem Spektralphotometer Pharmspec UV 1700 (Shimadzu, Duisburg/D) bestimmt. Die Proben werden mit 0.9% NaCl auf Werte $\text{OD}_{600} < 0.8$ verdünnt.
- II) Die Biotrockenmasse wird gravimetrisch bestimmt. Hierzu werden Eppendorf-Reaktionsgefäße beschriftet, getrocknet (80°C , 24 h) und gewogen (Halb-Mikrowaage Research R160 P, Satorius, Göttingen/D). Vor dem Wiegen werden die Gefäße im Exsikkator abgekühlt, um Kondensation zu vermeiden. 1 mL Kultursuspension wird für 10 min bei 13000 g zentrifugiert (Biofuge von Heraeus, Hanau/D), der Überstand verworfen, das Pellet in 1 mL 0.9% NaCl Lösung resuspendiert und erneut 10 min bei 13000 g zentrifugiert. Die Gefäße werden 24 h bei 80°C im geöffneten Zustand getrocknet. Die Biotrockenmasse wird durch erneutes Auswiegen bestimmt.
- III) Backscatter oder auch Rückstreulicht (Samorski et al. 2005) wird während BioLector-Kultivierungen online aufgezeichnet. Im Standardprotokoll *Rohe48* werden mit einer Messzykluszeit von 8 Minuten die Backscatterwerte aller 48 Flowerplate-Wells aufgenommen. Diese Online-Werte werden mit offline-Werten wie optischer Dichte und Biotrockenmasse kalibriert (s. Kapitel 5.2.2), indem Bioreaktorproben in eine Flowerplate ($V_L = 1 \text{ mL}$, beklebt mit Steril-Membran) pipettiert und im BioLector vermessen werden. Das Standardprotokoll

Rohe⁴⁸ des BioLectors wird mit einer dem jeweiligen Organismus entsprechenden Kultivierungstemperatur eingestellt (*C. glutamicum*, *B. subtilis*: 30°C, *E. coli*: 37°C). Da im ersten Messzyklus die Bedingungen (z.B. Temperatur) noch nicht konstant sind, werden für Kalibrierungen die Werte von Zyklus 2 bis 5 gemittelt.

4.4.2 Enzymatische Glucosemessung

Die Konzentration von Glucose in Kultivierungsüberständen wird mit dem EBIO compact Blutzuckermessgerät (Eppendorf, Hamburg/D) mittels enzymatisch-amperometrischen Messprinzip bestimmt. Um im linearen Bereich zu messen, werden die Proben auf unter 2 g L⁻¹ Glucose verdünnt.

Die Glucosekonzentration zur Bestimmung der enzymatischen Glucosefreisetzungsrates in Fed-Batch-Medien (Kapitel 6.4.2) wird wegen erhöhtem Probenaufkommen mithilfe eines MTP-Assays nach der Hexokinase/Glucose-6-Phosphat Methode (Peterson and Young 1968) als Triplicate gemessen. Hierzu werden Proben auf unter 0.5 g L⁻¹ Glucose verdünnt. 40 µL dieser Probe werden in einem Well einer MTP pipettiert und mit 200 µL der Gebrauchslösung (s. Tabelle 4.7) vermischt. Nach einer 45 minütigen Inkubation bei 37°C und einer Schüttelfrequenz von ca. 300 min⁻¹ wird die Absorption bei 340 nm im Genios MTP Reader (TECAN, Crailsheim/D) gemessen. Für eine Kalibrierung werden in jeder MTP sechs Lösungen bekannter Glucose-Konzentration zwischen 0 und 0.5 g L⁻¹ in Doppelbestimmung vermessen.

Tabelle 4.7: Stammlösungen und Gebrauchslösung des enzymatischen MTP Glucose-Assays.

Name	Substanz	Einwaage	
TM-Puffer	TRIS	12.1 g	In ca. 800 mL lösen, pH = 6.8 einstellen mit 2 M NaOH, auf 1000 mL auffüllen
	Maleinsäure	11.6 g	
Mg ²⁺	MgSO ₄ · 7 H ₂ O	2.66 g	• Auf 100 mL auffüllen
Enzymlösung	HK+ G6P-DH ¹	0.246 g	Auf 100 mL auffüllen, ca. 1 Monate haltbar bei 4°C
Gebrauchslösung (für 1 MTP)	TM-Puffer	23.6 mL	24 h haltbar bei 4°C
	Enzymlösung	0.25 mL	
	Mg ²⁺	1 mL	
	NADP · 2 H ₂ O	25 mg	
	ATP · 2 Na	17 mg	

¹ Sigma Aldrich, Enzymmischung, Produkt-Nr.: H8629

4.4.3 Organische Säuren mittels HPLC

Die Konzentration von Pyruvat, Acetat und Lactat in Kultivierungsüberständen wird mittels *High performance liquid chromatography* (HPLC, 1100 Serie, Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen/D) mit einer Methode ähnlich der von Schneider and Wendisch (2010) bestimmt. Hierzu wurden 0.22 µm-filtrierte Überstände um Faktor 2 mit VE-Wasser verdünnt. 10 µL der Probe, aufgetragen durch einen Autosampler (1100 Serie, Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen/D) werden isokratisch mit einem Durchfluss von 0.5 mL·min⁻¹ H₂SO₄ (0.1 M) über eine Organic Acid Resin (300 x 8 mm, CS-Chromatographie/D) bei 40°C aufgetrennt. Die Chromatogramme der Proben werden anhand der Retentionszeit und des Spektrums mit der Software Chromeleon identifiziert und die integrierten Flächen mit ebenfalls vermessenen Standardkonzentrationen kalibriert.

4.4.4 Zellaufschluss in MTP

Der Zellaufschluss mit Proben aus MTP-Kultivierungen erfolgt enzymatisch mit Lysozym. Die Aufschlusslösung besteht aus 1 g·L⁻¹ Lysozym gelöst in Sörensenpuffer (pH = 8) und 0.5% (v/v) Emulgator Tween 20. Diese Lösung wird bei 4°C gelagert und spätestens nach 5 Tagen neu angesetzt. Zum Aufschluss werden 100 µL Probe mit 100 µL Aufschlusslösung gemischt, 10 min bei Raumtemperatur unter Schütteln (300 min⁻¹) inkubiert und anschließend zentrifugiert.

4.4.5 Zentrifugation von MTP

Entnommene Proben werden mit der IXION High Speed (HS) Zentrifuge mit maximal 4000 g zentrifugiert. Zwei gefüllte DWP wiegen weniger als die maximal zulässige Beladung von 2 x 250 g. Die Zentrifuge hat eine Auto-Stopp-Funktion bei nicht austarierten DWPs. Bei etablierten Pipettierprotokollen wird die Zentrifuge automatisiert beladen und gestartet. Wird aber mit neu erstellten Pipettierprotokollen gearbeitet, so sollten aus Sicherheitsgründen Platte und Gegengewicht manuell mit einer Genauigkeit von ± 0.1 g austariert werden.

4.4.6 Lipase-Assay

Die lipolytische Aktivität der Zielproteine wird mittels photometrischem MTP-Assay nach Winkler and Stuckmann (1979) mit dem Substrat p-Nitrophenyl-palmitat (pNPP) bestimmt.

Es werden 20 µL der verdünnten Enzymlösung (*C. glutamicum*: Faktor 400 bis 1000) in MTP vorgelegt. 180 µL der frisch angesetzten Arbeitslösung (Tabelle 4.10) werden mit einer Multi-

channelpipette (Research Pro 1200, Eppendorf) hinzu gegeben und anschließend alle 30 sec. mit zwischenzeitlichem Schütteln in einem Zeitraum von 40 Minuten im Genios MTP Reader bei $\lambda = 410 \text{ nm}$ vermessen. Ausgabe des Assays ist die lineare Steigung der gemessenen optischen Dichte $\Delta OD_{410,roh} [\text{min}^{-1}]$. Die Steigung sollte einen Wert von 0.8 nicht überschreiten. Ist sie höher, muss der Assay mit stärkerer Probenverdünnung wiederholt werden. In jeder Assay-MTP muss ein Nullwert mit Wasser anstelle von Enzymprobe aufgenommen werden. Dieser Wert $\Delta OD_{410,null}$ muss von den übrigen Probenwerten $\Delta OD_{410,roh}$ abgezogen werden. Es ergibt sich ΔOD_{410} , mit dem die Zielgröße der lipolytischen Enzymaktivität in $\text{kU} \cdot \text{L}^{-1}$ nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz berechnet werden kann:

$$EA = \frac{V_{\text{Assay}} \cdot F_{\text{Verd}} \cdot \Delta OD}{E \cdot V_{\text{Probe}} \cdot d} = 1 \cdot \frac{\mu\text{mol}}{\text{min} \cdot \text{mL}} = 1 \frac{\text{kU}}{\text{L}} \quad \text{Formel 4.1}$$

EA	Enzymaktivität	Zielgröße	$\text{kU} \cdot \text{L}^{-1}$
F_{Verd}	Verdünnungsfaktor der Probe	z.B. 400	-
V_{Assay}	Volumen des Assays	0.2	mL
ΔOD	Änderung der optischen Dichte ($\lambda = 410 \text{ nm}$)	Messgröße	min^{-1}
E	Extinktionskoeffizient	15	$\text{cm}^2 \cdot \mu\text{mol}^{-1}$
V_{Probe}	Probenvolumen	0.02	mL
d	Schichtdicke	0.567	cm

Bis auf den Start der Reaktion durch Zugabe von Arbeitslösung werden alle Pipettierschritte in MTP mit dem JANUS Pipettierroboter durchgeführt. Jede lipolytische Enzymaktivität in dieser Arbeit wird mit einem nicht in den Roboter eingebundenen MTP-Platereader, dem TECAN Genios Pro gemessen. Der neuere Platereader Enspire wurde erst später zugekauft. Anhand der Vermessung von Referenzüberständen in beiden Geräten wird deutlich, dass der neu integrierte Platereader Enspire im Rahmen des statistischen Fehlers die gleiche lipolytische Aktivität misst wie der Genios Pro.

Tabelle 4.8: Assaypuffer: Phosphatpuffer nach Sörensen (50 mM) mit emulgierenden Substanzen.

Substanz	für 1 L Puffer
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	9.42 g
KH_2PO_4	0.37 g
	In 1 L VE-Wasser lösen, pH 8,0-8.2 überprüfen. Dann unter Rühren zugeben:
Gum arabic	1.11 g
Deoxycholicacid	2.30 g

Tabelle 4.9: pNPP Substanzlösung für den Lipase-Assay.

Substanz	Für 0.1 L Substrat
pNPP (p-Nitrophenyl Palmitat)	300 mg
+ Isopropanol	100 mL
	Lösen, leicht erhitzen, ggf. vortexen Bei 4°C dunkel gelagert ca. 2 Monate haltbar (solange nicht gelb gefärbt). Bilden sich Kristalle, können diese im Ultraschallbad wieder gelöst werden.

Tabelle 4.10: Arbeitslösung für den Lipase-Assay.

Substanz	Für 10 mL
Assaypuffer	9 mL
Zugabe unter Rühren:	
Substanzlösung	1 mL
	10 mL reichen für max. 48 MTP Proben. Lösung ist ca. 4 h verwendbar.

4.5 KULTIVIERUNGSSYSTEME

4.5.1 BioLector

Die folgende Beschreibung ist eine Standard BioLector-Kultivierung, von der es je nach Fragestellung Abweichungen gibt, die dann im entsprechenden Ergebnisteil vermerkt sind. In dieser Arbeit werden MTP-Kultivierungen in Flowerplates (m2p-labs, Aachen/D) durchgeführt, in denen Backscatter ($\lambda = 620 \text{ nm}$) und Fluoreszenz (*green fluorescent protein*, GFP: Ex/Em = 485 nm/520 nm; flavine based fluorescent protein, FbFP: Ex/Em 460 nm/520 nm) gemessen werden können. Der pH-Wert und der Sauerstoffpartialdruck werden mittels Optoden (John et al. 2003) gemessen, die am Well-Boden aufgeklebt mit den Flowerplates geliefert werden. Die Verarbeitung der Rohdaten erfolgt in der Software BioLection (m2p labs, Aachen/D), in der Kalibrierungsdaten der verwendeten Optodenchargen vom Hersteller zur Verfügung gestellt sind. Der Messbereich der pH-Optoden liegt zwischen 5 und 8.5 und der pO_2 -Optoden zwischen 0% und 100% Luftsauerstoff-Sättigung. Alternativ zur Flowerplate (48 Wells) können auch 96er MTP mit flachem, transparentem Boden und schwarzen Wänden verwendet werden (Greiner Bio One, Frickenhausen/D), wofür im BioLector das Layout mtp96 eingestellt werden muss.

Für die Medienpräparation und das Animpfen von Flowerplates gibt es eine manuelle und eine automatisierte Methode.

Manuelle Medienpräparation:

Die Verpackung der Flowerplate wird unter einer Sterilwerkbank geöffnet. 950 μL steriles Medium werden in die jeweiligen Kavitäten pipettiert und mit 50 μL Zellsuspension aus einer vitalen Vorkultur angeimpft.

Automatisierte Medienpräparation:

Zur Vorbereitung wird die Klappe der Laminar-Flow-Einhausung geschlossen, der Filter auf *Tagstand* gestellt, das Roboterprogramm „*Daily Decontamination.mth*“ gestartet (Ethanol und Wasser-Spülschritte) und das Deck, sowie die Arbeitsfläche mit Pursept 5% desinfiziert. Der Counter (8 h Inkubation mit EtOH) des Roboterprogramms kann übersprungen werden. Das Medium wird anschließend unter der Einhausung steril in einen 60 mL Trough gegeben, die Flo-

werplate ausgepackt und auf dem Roboterdeck positioniert. Die Methode „*Medienverteilen.mth*“ wird gestartet. Zum Animpfen aus nur einer Vorkultur kann das Roboterprotokoll „*Animpfen.mth*“ verwendet werden. Hierfür muss die Vorkultur kurz vor dem Methodenstart in einen 60 mL Trough gegeben werden.

Die Oberseite der Flowerplate wird mit einer *gaspermeable membrane* (m2p labs, Aachen/D) beklebt und die Flowerplate selbst im BioLector fixiert. Der BioLector wird durch einen internen Computer und der Software BioLector-HMI gesteuert. Im Protokoll Rohe48 sind standardmäßig folgende Einstellungen für Flowerplate-Kultivierungen programmiert: Schüttelfrequenz $n = 1200 \text{ min}^{-1}$, Volumen $V_{\text{End}} = 1000 \text{ }\mu\text{L}$, Rel. Luftfeuchte $> 90\%$ geregelt (75 -80% bei 30°C erreicht), Temperatur $T = 30^\circ\text{C}$ (für *C. glutamicum* und *B. subtilis*). Die Einstellungen des Messsignal-Verstärkers sind in *Rohe48*: Backscatter Gain = 20, FbFP Gain = 60, GFP Gain = 60.

4.5.2 DasGip 1.5 L

Bei der Vorbereitung und Kultivierung in Bioreaktoren im Labmaßstab werden 4 parallele 1.5 L DasGip-Glasfermenter (SR1000ODLL, $d_i = 110 \text{ mm}$, $H = 245 \text{ mm}$) mit einem BioBlock-System (DasGip, Jülich/D) verwendet. Bei der Anlagenkalibration (Pumpraten, pH, $p\text{O}_2$) und der Kultivierung selbst wird das Prozessleitsystem „*DasGip Manager*“ (Version verwendet.

Die Bioreaktoren werden zusammengesetzt (Strombrecher, zwei Rushton-Turbinen mit $d = 45 \text{ mm}$), unsteril mit 950 mL Medium befüllt, mit kalibrierten pH-Elektroden versehen, autoklaviert und in der Temperierstation *BioBlock* aufgebaut. Nach der Zugabe von thermolabilen Medienbestandteilen werden die Prozessbedingungen ($p\text{O}_2$, pH, T) eingestellt. Eine pH-Korrektur erfolgt mit $4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ HCL}$ und $4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NaOH}$. Der $p\text{O}_2$ wird auf $> 30\%$ in einer Kaskade aus Rührerdrehzahl (400 min^{-1} bis 1500 min^{-1}) und Begasungsrate ($60 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$ - $120 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$) geregelt. 50 mL vitale Vorkultur dienen als Inokulum, wodurch das Animpf-Verhältnis von 5% v/v dem im BioLector entspricht. Das Probenahme-Intervall in der Lag-Phase (hier: $\text{OD}_{600} < 1$) beträgt 2 h, in der exponentiellen und ggf. in der Feedphase 1 h.

4.5.3 Chemap 30 L

Für Versuche der Maßstabsübertragung wird ein Chemap-Bioreaktor ($V = 30 \text{ L}$, $d_i = 260 \text{ mm}$, $H = 560 \text{ mm}$) verwendet. Dieser ist ausgestattet mit zwei Rushtonturbinen ($d = 90 \text{ mm}$) und verfügt über ein Prozessleitsystem (PLS, iCCC 2000 von PCS Systemtechnik GmbH, München/D), mit dem die Ventile geschaltet und Prozessparameter geregelt werden. Der Sterilisationsprozess

des Reaktorraumes erfolgt gesteuert vom PLS durch die Einspeisung von Heißdampf. 15 L unsteriles Medium werden über Sterilfilter (Sartopore Capsule Filter, Sartorius, Göttingen/D) in den sterilisierten Reaktor gepumpt. In den Säure- und Base-Vorlagegefäßen muss relativ zum Bioreaktorraum ein Überdruck von 0.3 bar herrschen. Die Zugabe erfolgt über Öffnen und Schließen von pneumatischen Ventilen, die vom PLS gesteuert werden. Als pH-Korrekturmittel dienen 25% (w/w) H_3PO_4 und 25% (w/w) Ammoniak. Der pO_2 wird auf $> 30\%$ zum einen in einer Rückkopplungsschleife mit dem Rührer (400 min^{-1} bis 950 min^{-1}) und zum anderen manuell mit der Begasungsrate (850 L h^{-1} bis 1800 L h^{-1}) und dem Druck im Reaktor (bis 0.8 bar Überdruck) geregelt. Zur Inaktivierung der Kultursuspension wird der Reaktorraum wieder mit Heißdampf sterilisiert und anschließend gereinigt.

4.6 ROBOTIK

An dieser Stelle werden die Einzelkomponenten der neuen Robotik-Anlage und deren Hauptspezifikationen nur aufgelistet. Eine genauere Beschreibung der Funktionsweise der gesamten Anlage sowie deren Softwarestruktur ist in Kapitel 5.1 des Ergebnisteils zu finden.

Tabelle 4.11: Hardware der Robotik-Plattform. Angaben zum Aufbau vgl. auch Kapitel 5.1 des Ergebnisteils.

Hardware	Name	Spezifikationen	Hersteller
Mikrokultivierungssystem	BioLector MB	BJ 12/2008, Spezifikationen s. Kapitel 4.5,	m2p labs, Aachen/D
Multilabel Plate Reader	Enspire	Monochromator-basierter Platereader, Temperierfunktion	PerkinElmer, Rodgau/D
Pipettierroboter	JANUS Integrator	Stellplatz für maximal 24 MTP	
Pipettierarm	Varispan	8 beschichtete Stahlnadeln an einem Liquid Handling Arm mit 4 Freiheitsgraden (X, Y, Z, Abstand der Nadeln zueinander) 1 mL Spritzen	
MTP Gripper	Railgripper	Robotik-Greifarm mit 4 Freiheitsgraden (X, Y, Z, Drehung in X/Y-Ebene)	
Rail Extension	[Maßfertigung]	Erweiterung der Robotik-Schiene um 2 cm	

Hardware	Name	Spezifikationen	Hersteller
MTP Zentrifuge	Ixion HS (High Speed)	Zwei Stellplätze für MTP oder DWP < 4000 g	Sias, Hombrechtikon/CH
MTP Schüttler	Teleshake 95	Heizen von (RT+4°C) bis 95°C Schütteln mit max. 2000 min ⁻¹ (leer)	Inheco, Martinsried/D
MTP Heizblock	Heatpac	Heizen von (RT+4°C) bis 125°C	
Steuerungsmodul	MultiTec Controller	Manuelle und automatisierte Steuerung von bis zu 6 Inheco-Geräten	
Umwälzkühler	Unichiller	Flüssigkeits-Temperierung zwischen -10°C bis 40°C	Huber, Offenburg/D
DWP Kühlblock	Chillstation	Flüssigkeitsdurchspüler Adapter für Deepwellplatten	Mecur, Groveland/USA
Einhausung	[Maßfertigung]	Laminares Downflow System, Produktschutz (kein Personenschutz) HEPA-Filter Typ H14	Cleanair/LMC, Woerden/NL
Gerätefixierung	[Maßfertigung]	Aluminiumplatten um Hardware zu fixieren	FZJ
MTP Reader	Genios	Filter-basierter Platereader	TECAN, Crailsheim/D

Tabelle 4.12: Software der Robotik-Plattform. Weitere Angaben vgl. auch Kapitel 5.1 des Ergebnisteils.

Software	Name, Ausführung	Hersteller
Robotersteuerung	WinPrep V 4.6.0.0014	PerkinElmer, Rodgau/D
Treiber zur Enspire Steuerung	Enspire Service Host	
Treiber zur MTEC Steuerung		
Datenauswertung	Enspire Manager V 3.0	
Zentrifugensteuerung	X-Util	Sias, Hombrechtikon/CH
Datenauswertung Gerätekommunikation Firmware auf BioLector	BioLecture V 2.2 RoboLector Agent V 1.2 BioLecture HMI	m2p labs, Aachen/D

5 SYSTEMAUFBAU UND VALIDIERUNG

5.1 AUFBAU DER AUTOMATISIERTEN KULTIVIERUNGS- PLATTFORM

Sowohl die Vorbereitung, als auch die anschließende Verarbeitung von hochparallelen Kultivierungsansätzen bewirken ein vermehrtes Arbeitsaufkommen. Um bei diesen Arbeiten zeitliche Engpässe zu vermeiden, sollten Standardarbeitsschritte wie Medienpräparation, Inokulation, Probenahme und Probenverarbeitung parallelisiert und wenn möglich automatisiert durchgeführt werden. Diese Durchsatzerhöhung wird in dieser Arbeit auf der Kultivierungsplattform JUELICH BIOPROCESS OPTIMIZATION SYSTEM (JUBOS, Foto s. Abbildung 5.8) realisiert. Diese Plattform ist aufgebaut aus automatisiert steuerbaren Geräten die es ermöglichen, einen Workflow mikrobieller Kultivierungen halb-automatisiert durchzuführen. In dem folgenden Kapitel wird zunächst die Konzeption und der Aufbau der Anlage beschrieben.

5.1.1 Kategorisierung verfügbarer MBR-Technologien

Zu Beginn der Arbeit wurden verschiedene Kultivierungssysteme anhand technischer Spezifikationen kategorisiert. Eine Entscheidung für ein zukünftig verwendetes System sollte anhand von Kriterien erfolgen (s. Tabelle 5.1), die einen Standardbetrieb zur Optimierung der Produktion heterologer Proteine erleichtern. Zwei Anlagen mit parallelen Modellbioreaktoren sind in der Tabelle 5.1 als Referenzsysteme mit aufgeführt.

Erstes Kriterium (Tabelle 5.1, Spalte 2) ist der experimentelle Durchsatz, der aufgrund des vermehrten Kultivierungsaufwandes bei Optimierungsversuchen einen hohen Stellenwert hat. Eine Automatisierung des MBR-Systems ist für den Flüssigkeitstransfer in und aus den Kultivierungen gewünscht (Spalte 3), sollte aber nicht verpflichtend für einen einfachen Standardbetrieb sein (Spalte 4). Der Sauerstoffeintrag als wichtige verfahrenstechnische Größe wird anhand des k_{La} -Wertes kategorisiert (Spalte 5), die Online-Aufzeichnung wichtiger Kultivierungsparameter ist wesentlich für einen hohen Informationsgehalt pro Kultivierung des MBR-Systems (Spalte 6).

Tabelle 5.1: Spezifikationen von verfügbaren MBR-Systemen. Betrachtet werden Parameter, die für einen Standardbetrieb zur Optimierung heterologer Proteinproduktion relevant sind. Abkürzungen: MBR = Mikrobioreaktoren, T = Temperatur, GA = Abgas Analyse, BTM = Biotrockenmasse, k.A. = Keine Angaben, Autom.: Automatisierung. BR = Bioreaktor.

Name	Durchsatz	Autom. des Flüssigkeits-Transfers	Ohne Autom. verwendbar gemäß Referenz?	$k_L a$ [h ⁻¹]	Online-Monitoring	Referenzen
DasBox (V _{max} = 250 mL)	< 20	Nein * ¹	ja	Modell-BR	pO ₂ , pH, T, GA, (BTM)	Fa. DasGip
Multifors 2 (V _{max} = 1000 mL)	6 bis 18	Nein * ¹	ja	Modell-BR	pO ₂ , pH, T, GA, (BTM)	Barnard 2010 Fa. Infors-ht
bioreactor48 (V _{max} = 12 mL)	48	Ja	nein	< 1600	pO ₂ , pH	Puskeiler 2005 Knorr 2007
BioLector (V _{max} = 1 mL)	48	Ja	Ja	< 1000	pO ₂ , pH, BTM, FL	Kensy 2009
μ24 (V _{max} = 9 mL)	24	Nein	Ja	< 250	pO ₂ , pH, T	Isett 2007 Chen 2009
AMBR (V _{Lmax} = 15 mL)	24 bis 48	Ja	Nein	k.A.	pO ₂ , pH	Fa. TAP Biosystems
MTP Schüttler Vertiga	96 bis 768	Nein	Ja	< 540	-	Hermann 2003 Brodsky 2006

*1: Geregelte, kontinuierliche Flüssigkeitsdosage (Säure, Base, Feed) in den Reaktor möglich.

Eine Durchführung aller Kultivierungsexperimente in parallelen Modellbioreaktoren (DasBox, Multifors) würde zu einem hohen Informationsgehalt führen, aber den experimentellen Durchsatz verringern. Bei stündlicher Probenahme von einem Laborarbeiter ist die handhabbare Anzahl paralleler Kultivierungen auf unter 15 beschränkt (Doig 2006). Da die Anlagen in Blöcken zu je 4 bzw. 6 parallelen Bioreaktoren (DasBox, bzw. Multifors) angeboten werden, müssten für einen hohen Durchsatz mehrere Anlagen gekauft werden, was zu hohen Investitionskosten führt.

Aus dem *bioreactor48*, einem Multi fermentersystem mit gasgetriebenen Rührwerken, lassen sich durch einen Pipettierroboter automatisiert Proben entnehmen. Hierdurch werden bis zu 48 Kultivierungsansätze parallel untersucht. Das Gerät ist aber für einen automatisierten Betrieb ausgelegt, eine einfache Nutzung ohne den Pipettierroboter ist nur unter Verzicht der Probenahme möglich. Gleiches gilt für das AMBR-System, eine ursprünglich für die Zellkulturtechnik entwickelte Pipettierroboter-MBR-Kombination mit nicht näher definiertem Sauerstoffübergang.

Wie beim AMBR-System stand die Kultivierung von Säugetierzellen stand ebenfalls bei der Entwicklung des *μ24* im Vordergrund, der im geschüttelten (unbegasten) Modus einen mit einem

niedrigen $k_L a$ von 60 h^{-1} erreicht. Für mikrobielle Kultivierungen kann die Sauerstoffversorgung dieses Blasensäulen-Systems jedoch mittels Strombrecher und Schüttelvorrichtungen auf ca. 250 h^{-1} erhöht werden. Da das System aber nicht ohne weiteres in einen Standard-Pipettierroboter integriert werden kann, sowie eine Online-Aufzeichnung von BTM oder Fluoreszenz fehlt, müssten für prozessrelevante Ergebnisse manuell Proben entnommen werden.

Bis auf den MTP-Schüttler haben alle Systeme eine Aufzeichnung von pH- und pO_2 -Werten, bei dem $\mu 24$ sogar eine Regelung dieser Werte. Eine Aufzeichnung hingegen von Biomassewerten und Fluoreszenzwerten (z.B. für die Quantifizierung fluoreszierender Proteine) ist nur mit dem BioLector (m2p-labs, Aachen/D) möglich. Hierdurch eignet sich das Gerät auch für einen Betrieb ohne Automatisierung. Für eine Probenahme oder eine Dosage von IPTG lässt sich das System aber auch mit einem Pipettierroboter kombinieren (Huber et al. 2009). Durch diese Eigenschaften entspricht der BioLector den geforderten Kriterien dieser Arbeit.

5.1.2 Kombination des BioLectors mit einem Pipettierroboter

Für eine Einbindung des BioLectors in einen Pipettierroboter ist das erste Kriterium die Abmessung und die sich daraus ergebende Anordnung der jeweiligen Instrumente. Ein bereits im Institut vorhandener Pipettierroboter des Typs EVO 200 (TECAN, Crailsheim/D) war für eine Einbindung des BioLectors aufgrund der geringen Höhe zwischen Robotik-Deck und Robotik-Armen nicht geeignet. Der BioLector hätte zweigeteilt werden müssen, wie von Huber et al. (2009) bei der Integration des MBR in einen Hamilton-Pipettierroboter durchgeführt. Die niedrige Inkubationskammer des BioLectors wurde von Huber et al. auf dem Roboterdeck positioniert, während die große Messeinheit mit einem Glasfaserkabel verbunden neben dem Roboter installiert wurde. Eine zweite Möglichkeit ist die in einer Pressemitteilung veröffentlichten Variante der Firma m2p-labs (von Glasow 2011), in der 50 cm des Decks des TECAN-Pipettierroboters hätten abgetrennt werden müssen. Dies schränkt den Platz auf dem Roboterdeck ein und behindert die Anbindung weiterer Geräte unter und neben dem Roboter (Zentrifuge, MTP-Reader, MTP-Lagerung). Dadurch wäre die Flexibilität des TECAN-Roboters eingeschränkt und geplante Projekte erschwert.

Der Pipettierroboter JANUS Integrator (PerkinElmer, Rodgau/D) besitzt mit dem sog. *Offdeck* eine Fläche für vereinfachte Systemintegration von Fremdgeräten, wodurch zum einen der BioLector und zum anderen weitere Instrumente installiert werden können, ohne das Roboterdeck abzuschneiden. Die einzelnen Hardwarekomponenten und deren Spezifikation sind im Material

und Methodenteil in Tabelle 4.11 (Seite 45) aufgelistet. Im nachfolgend beschriebenen Anlagen-design werden hieraus die wichtigsten Instrumente und deren Verknüpfung zur Gesamtanlage, dem JUELICH BIOPROCESS OPTIMIZATION SYSTEM (JUBOS) beschrieben.

Der Aufbau dieser Anlage erfolgte in einem neu konzipierten Labor, in dem neben der hier thematisierten automatisierten Kultivierungsplattform weitere Robotik-Elemente installiert wurden. Der in der Planung entstandene Laborflächenplan des Robotik-Labors ist im Anhang Abb. 1 (S. 143) aufgeführt.



Abbildung 5.1: Automatisiertes Mikrobioreaktorsystem: JUELICH BIOPROCESS OPTIMIZATION SYSTEM (JUBOS). Die Roboterarme VarispanTM (8 Nadel Pipettierarm) und GripperTM (MTP-Greifer) sowie das (Off-)Deck sind Teil des JANUS Pipettierroboters. Anlage mit geöffneter Klappe der Sterileinhausung.

Pipettierroboter als Kernsystem

Das Kernsystem des JUBOS ist der Pipettierroboter *JANUS Integrator* der Firma PerkinElmer. Der Roboter besteht im Wesentlichen aus dem *Deck* und den beiden Roboterarmen *Railgripper*TM zum Plattentransport und *Varispan*TM für paralleles Pipettieren mit 8 Stahlnadeln. Auf dem Deck

werden MTP und andere Flüssigkeitsgefäße an einem X-Y-Raster definiert positioniert. Beide Roboterarme bewegen sich in X-Richtung auf einer Schiene, die auf der rechten Seite 42 cm über dem sogenannten Off-Deck überhängt (s. Abbildung 5.2). Hier können weitere automatisierte Geräte installiert und durch die Roboterarme angesteuert werden.

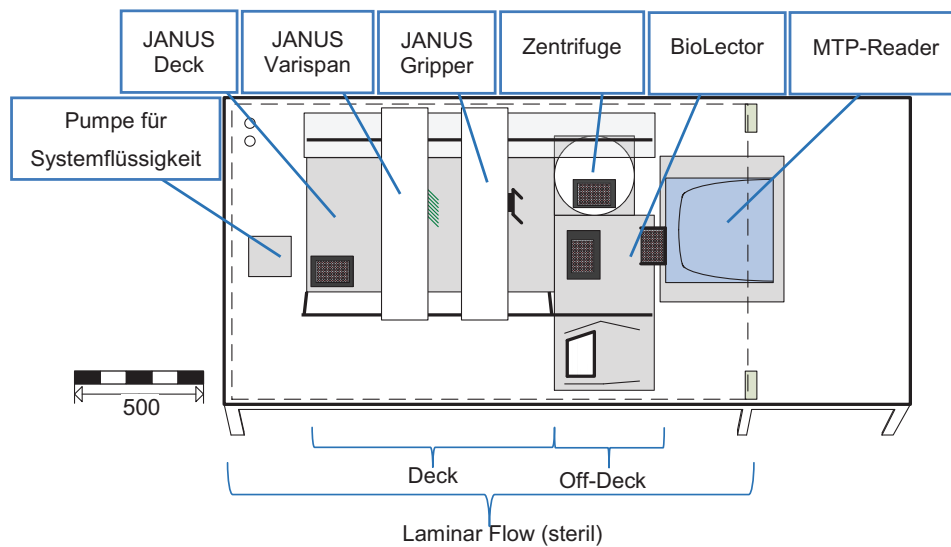


Abbildung 5.2: Zeichnung des JuBOS in der Ansicht von oben. Maße vgl. Maßstabsbalken. Gestrichelt eingerahmter Bereich befindet sich im sterilen Laminar-Flow-Bereich der Einhausung. (Zeichnungssoftware: MS Visio 2007)

Anbindung von BioLector, Platerader und Zentrifuge

Ziel beim Anlagenaufbau ist es, im späteren Betrieb aus einer 48-Well MTP (Flowerplate) im Mikrokultivierungssystem BioLector Flüssigkeiten entnehmen und hinzugeben zu können. So soll während der Kultivierung die Entnahme von Kultursuspension oder die Flüssigkeitszugabe von z.B. IPTG ermöglicht werden. Hierfür werden der BioLector und die IXION MTP Zentrifuge auf einer Stahlplatte¹ fixiert, die am Roboter selbst befestigt ist. Der BioLector ist auf dieser Platte um 90° gedreht, wodurch die Öffnung der Inkubationskammer auf dem Off-Deck liegt (s. Abbildung 5.2) ist und die Pipettiernadeln alle 48 Wells einer Flowerplate im BioLector erreichen

¹ Gefertigt von Mario Fricke, IBG-1

können. Ebenfalls wird hierfür die normalerweise 487 mm über das Deck hinausragende Schiene der Roboterarme auf 503 mm erweitert².

Der MTP Reader Enspire (PerkinElmer) ist am Rand des Off-Decks auf 8 cm hohen Stahlfüßen positioniert. Die darunter befindliche Bodenplatte ist an der Cleanbench selbst befestigt. Eine direkte Verbindung zwischen den beiden Fixierplatten wird wegen des Übertrags möglicher Erschütterungen des BioLector/Roboter/Zentrifuge-Konstrukts auf den MTP-Reader vermieden. Durch die erhöhte Position des Readers wird die MTP-Schublade über dem BioLector ausgefahren. Sie ragt soweit in den Offdeck-Bereich des Pipettierroboter hinein, dass der Railgripper MTPs für photometrische Messungen zum Reader transportieren kann.

5.1.3 Softwarestruktur zur Geräteansteuerung

Zur Steuerung des Roboters wird die Software WinPrep von PerkinElmer verwendet. Auf der grafischen Oberfläche dieser übergeordneten Software werden Events in einer *Methode* (.mth-Datei) aneinander gereiht (Screenshot s. Anhang S. 144). Nach einem Kompilierungsschritt der gesamten Methode werden diese Events chronologisch abgearbeitet oder bei Bedarf in einer Schleife wiederholt. Als Events dienen z. B. standardmäßige Pipettierbefehle der WinPrep-Software, wie ein einfacher Flüssigkeitstransfer von A nach B oder auch komplexer aufgebaute serielle Verdünnungsreihen.

Ebenfalls werden Fremdgeräte mittels Hilfssoftware in WinPrep-Protokolle eingebunden (s. Abbildung 5.3). Die Zentrifuge wird durch die Software X-Util gesteuert. Der Befehl von WinPrep an diese Software erfolgt dabei über ein Makro. Die Parameter (Zeit, Geschwindigkeit, Beschleunigung) müssen dazu vorher in einer Textdatei hinterlegt werden. Der MTP-Reader, das 3-Wege-Ventil der Desinfektions-Systemflüssigkeit, und der Inheco-Schüttler werden über Befehle der WinPrep gesteuert, die dort auch direkt konfigurierbar und so auf der grafischen Oberfläche einfach zu handhaben sind.

Auch der BioLector ist für eine Automatisierung in die Softwarestruktur eingebunden. Hierbei wird die Software „RoboLector Agent“ (m2p labs, Aachen/D, Screenshot s. Anhang S. 144) verwendet, welche auf vorherigen Arbeiten von Huber et al. (2009) basiert. In dieser Software wird definiert, bei welchem Schwellenwert (Trigger) Pipettierschritte ausgeführt werden sollen und wie viel Flüssigkeitsvolumen dabei transportiert wird. Als Trigger können Werte der BioLector

² Durchgeführt von Jens Hamann, PerkinElmer

Online-Analytik (Backscatter, Fluoreszenz, pO_2 , pH) oder der Prozesszeit verwendet werden. Ebenfalls sind eine Kombination von zwei Triggern, sowie eine Wiederholung mit festen Zeitintervallen möglich. Die Kommunikation zwischen BioLector und RoboLector erfolgt via TCP/IP, die Übergabe von Daten vom RoboLector Agent an die WinPrep-Software erfolgt über eine .csv-Datei. Der Speicherort für diese Datei auf der Festplatte des Prozessrechners wird von WinPrep einmal pro Sekunde ausgelesen. Ist ein Schwellenwert überschritten, schreibt RoboLector diese Datei mit den nötigen Werten, setzt den BioLector auf „Pause“ und öffnet die Inkubationsklappe. Der Pipettierroboter hat nun die notwendigen Werte, um die Pipettierbefehle auszuführen. Sind diese durchgeführt, wird die Datei im WinPrep-Protokoll gelöscht, die Klappe schließt sich, und die Kultivierung wird fortgesetzt. Ob die Flowerplate während des Pipettiervorgangs geschüttelt wird oder nicht, kann in der RoboLector-Software eingestellt werden.

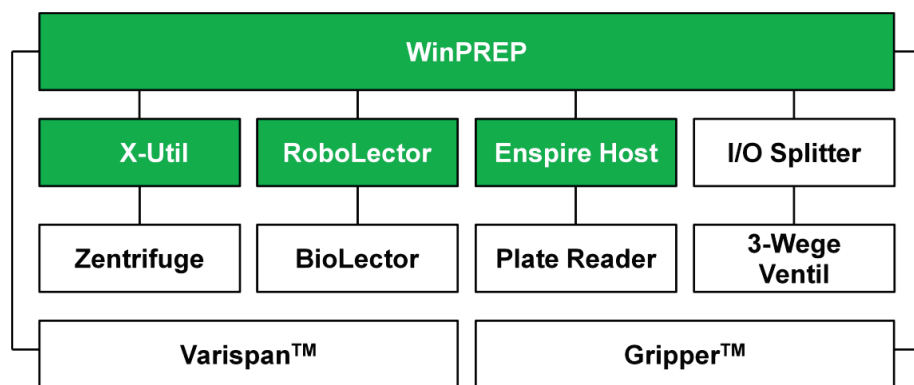


Abbildung 5.3: Aufbau und Steuerung der JuBOS-Anlage. Grüne Felder sind Softwareelemente, weiße Felder sind Hardwareelemente.

Die beschriebene Geräte-Kommunikation mittels Text-Dateien ist ein an sich altes Konzept, das z. B. Probleme bei gleichzeitigem Lesen und Schreiben hervorruft. Durch den RoboLector Agent sind die Phasen von Schreiben und Auslesen der Datei aber klar strukturiert, wodurch wegen dieser Problematik keine Prozessabstürze beobachtet werden. Zu einem Abbruch des Prozesses kommt es jedoch, wenn die Zeit eines BioLector-Messzyklus nicht korrekt gewählt wird. In dieser vom Benutzer einstellbaren Zeit wird die Dauer definiert, in der alle Messgrößen (Backscatter, pO_2 ...) einer MTP einmal ausgelesen werden. Pro Messgröße müssen mindestens zwei Minuten eingeplant werden. Bei Unterschreiten dieser minimalen Zykluszeit wird bei Pro-

tokollen ohne Roboteranbindung eine Fehlermeldung ausgegeben. Bei automatisierten Protokollen muss diese minimale Zeit drei Minuten höher liegen, also: Zykluszeit = Filteranzahl * 2 min + 3 min, es erscheint jedoch keine Fehlermeldung bei Nichtbeachtung dieser Regel. Wird diese minimale Zeit nicht beachtet, kann es während der Kultivierung zu Abstürzen der Firmware BioLecture HMI kommen, was dann ein Ende der Kultivierung bedeutet.

5.1.4 Steriltechnik für mikrobielle Arbeiten

Validierung der maßgefertigten Laminar-Flow-Einhausung (Cleanbench)

Die gesamte Robotikplattform ist in einer maßgefertigten Sterilwerkbank (CleanAir, Utrecht/NL) aufgebaut. Ingenieure der Firma CleanAir entwarfen die Einhausung nach einem durch das IBG-1 erstellten Pflichtenheft. Eine Skizze des letzten Modells ist in Abbildung 5.4 dargestellt.

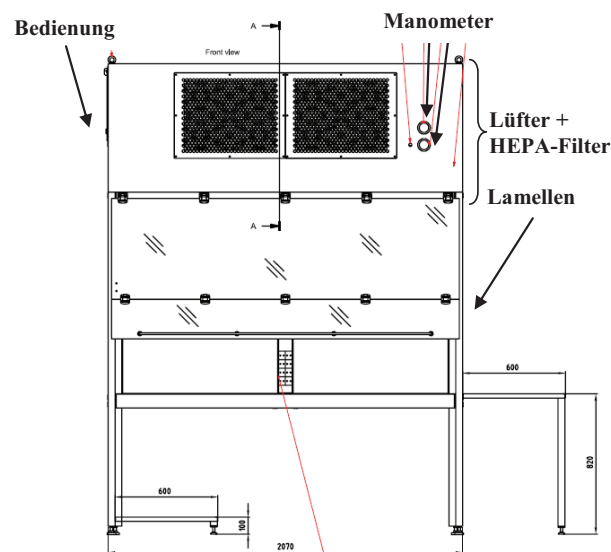


Abbildung 5.4: Konstruktions-Skizze des Laminar Flow Systems (Cleanbench). Über einen oben aufliegenden HEPA-Filter wird in die Plexiglas-umrahmte Einhausung sterile Luft zugeführt. Anstelle des Plexiglasses sind an der rechten Seite flexible Lamellen für eine Geräteintegration (Platereader) angebracht. Entnommen aus dem Lastenheft (LMC Medical, CleanAir).

Ein oben aufliegender HEPA-Filter (*High Efficiency Particulate Airfilter*) soll eine Kontamination mit Luftkeimen verhindern. Der rechte Tisch ist über Plastik-Lamellen mit dem Innenraum verbunden. So kann der Platereader halb im Laminar Flow stehen und es wird nicht benötigte Sterilfläche und damit Filterleistung eingespart. Auf diesem angrenzenden Tisch befindet sich ebenfalls der Monitor des Prozessrechners, die Frontscheibe ist z.B. für Wartungsarbeiten am Roboter komplett aufklappbar.

Die Cleanbench kann in den beiden Einstellungen „Betrieb“ und „Stand-By“ betrieben werden, die sich im Wesentlichen durch die Leistung des Lüfters unterscheiden. Da es sich um eine neuartige, maßgefertigte Werkbank mit drei offenen Seiten handelt, muss die Sterilität der Luft überprüft werden. Dabei werden die beiden Modi der Cleanbench „Betrieb“ und „Stand-By“ gegenübergestellt. Luftkeime werden innerhalb von 60 min auf insgesamt 35 geöffneten LB-Agarplatten aufgefangen, und für 18 h bei 37°C inkubiert. Drei im Labor verteilte Agarplatten (Boden, Fensterbank, Schrank) dienen als Positiv-Kontrolle der Umgebungsluft. Die ausgezählten Koloniebildenden Einheiten (KBE) dieser Agarplatten werden in Prozent zu dem Mittelwert der Positivkontrollen berechnet und sind in Abbildung 5.5 dargestellt.

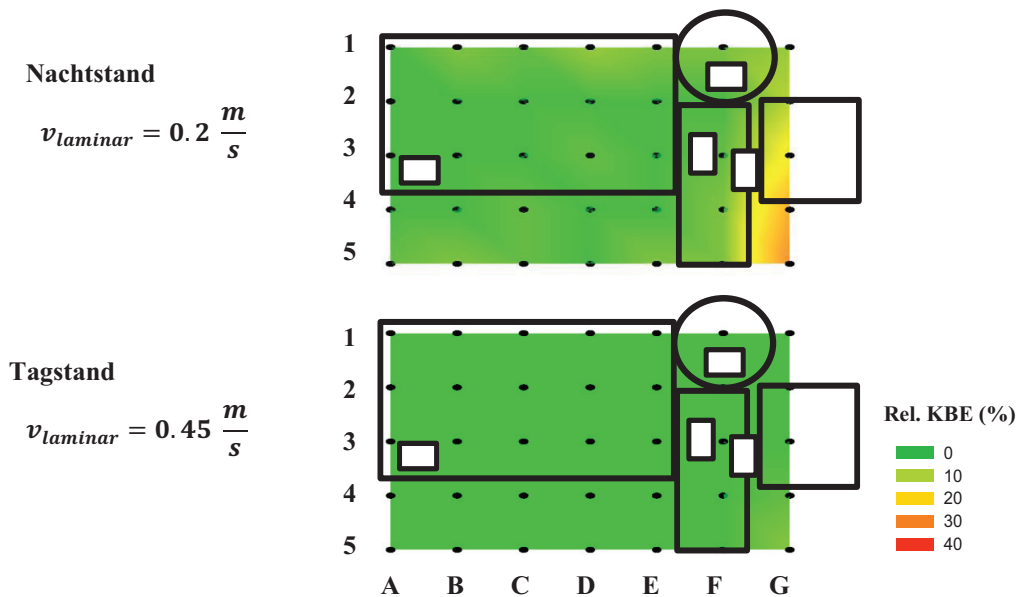


Abbildung 5.5: Sterilitätstest der Laminar-Flow Einhausung: Ansicht von oben (vgl. Abbildung 5.2), Geräte sind schwarz umrahmt. Weiße Rechtecke stellen festgelegte Positionen von MTPs dar, schwarze Punkte sind Positionierungen der Agarplatten. Oben: Nachtstand bei geringem laminarem Luftstrom $v_{laminar}$. Unten: Tagstand mit hohem laminarem Luftstrom $v_{laminar}$. Farben repräsentieren die relativen Kolonie Bildenden Einheiten (KBE) in % zu der Positivkontrolle (drei Agarplatten im Labor verteilt mit $KBE = 36 \pm 6 h^{-1}$).

Tabelle 5.2: Sterilitätstest der Laminar-Flow-Einhausung: Koloniebildende Einheiten pro Stunde ($\text{KBE} \cdot \text{t}^{-1}$) von 35 Platten verteilt auf dem Roboterdeck, angeordnet in Spalten (A-G) und Zeilen (1-5) gemäß Abbildung 5.2.

		$\text{KBE} \cdot \text{t}^{-1} [\text{h}^{-1}]$						
		A: <i>Nachtstand</i>						
Zeile \ Spalte		A	B	C	D	E	F	G
1		0	2	1	2	2	2	2
2		0	0	0	0	0	0	3
3		0	0	0	1	0	1	5
4		0	0	1	0	0	2	8
5		1	2	1	0	1	2	10
		B: <i>Tagstand</i>						
Zeile \ Spalte		A	B	C	D	E	F	G
1		0	0	0	0	0	0	0
2		0	0	0	0	0	0	0
3		0	0	0	0	0	0	0
4		0	0	0	0	0	0	1
5		0	0	0	0	0	0	2
Referenzplatten:		Boden: 30	Laborbank: 42	Schrank: 35	Mittel: $\text{KBE}_{\text{ref}} \cdot \text{t}^{-1} = 36 \pm 6 \text{ h}^{-1}$			

Der Zustand „*Betrieb*“ erweist sich als leistungsstarke Luftreinigung ohne erhebliche Kontamination durch Luftkeime (B). Beim Zustand „*Stand-By*“ (A) werden in der Lücke zwischen Platereader und BioLector (Abbildung 5.5, unten rechts) Kontaminationen von 8 bzw. 10 $\text{KBE} \cdot \text{h}^{-1}$ (30 %) gemessen. Diese Werte liegen damit höher als der statistische Fehler der drei Referenzplatten von $\pm 6 \text{ KBE} \cdot \text{h}^{-1}$. An dieser Position sind jedoch keine steriltechnisch relevanten Stellplätze für MTPs vorgesehen. Auf dem für mikrobiologische Arbeiten relevanten Roboterdeck wird auch beim *Stand-By*-Modus eine geringe Kontamination von unter 5% gemessen.

Anhand der Ergebnisse wird die Funktionalität der maßgefertigten Cleanbench deutlich. Für steriltechnisch sensible Arbeiten, wie z. B. das Pipettieren von Medien aus sterilen Stocklösungen sollte man den leistungsstarken Betriebszustand verwenden. Für einen längeren Dauerbetrieb wie z. B. die automatische IPTG-Zugabe über mehrere Tage reicht der *Stand-By*-Zustand mit Werten von $< 5 \%$ KBE aus. Der Platz vor dem Roboterdeck erwies sich im *Betrieb*-Zustand als kontaminationsfrei, im *Stand-By*-Zustand werden hier niedrige Werte von 1-2 $\text{KBE} \cdot \text{h}^{-1}$ gemessen. Da die KBE Messung aber ohne eine Verwirbelung der Umgebungsluft erfolgte, sollten sterile Arbeiten auf dieser dem Labor zugewandten Fläche im „*Betrieb*“-Zustand durchgeführt werden. Somit ist auch diese Arbeitsfläche ebenfalls für mikrobiologische Arbeiten wie z.B. die manuelle Erstellung von Stocklösungen nutzbar.

Steriles Pipettieren mit der Roboterplattform

Mit den Stahlnadeln des JANUS-Roboters können in der verwendeten Konfiguration Volumina zwischen 5 μL und 1.2 mL pipettiert werden. Der Kolbenhub zur Aufnahme und Abgabe von Flüssigkeiten wird dabei durch die Bewegung von Systemflüssigkeit (VE-H₂O) im Schlauchsystem der Stahlnadeln realisiert. Acht Spritzen sorgen für den nötigen Unter- bzw. Überdruck der Systemflüssigkeit (vgl. Abbildung 5.6). Nach dem Flüssigkeitstransfer werden die Nadeln in einer Waschstation gewaschen. Hierzu wird Systemflüssigkeit mit einer Peristaltikpumpe durch die Nadeln in Vertiefungen gepumpt und somit innen und außen um die Nadelspitzen gespült. Zur Vermeidung chemischer Kontamination reichen diese vorkonfigurierten Spülschritte des Herstellers mit Wasser aus. Für mikrobiologische Arbeiten müssen die Stahlnadeln jedoch frei von vermehrungsfähigen Einheiten sein.

Um diese sterilen Bedingungen zu realisieren, wird neben der eigentlichen Systemflüssigkeit (VE-Wasser) ein zweites Vorratsgefäß mit Desinfektionslösung (70% v/v Ethanol) installiert. Ein Drei-Wege Ventil (Bürkert, Ingelfingen/D) wird durch den I/O-Port des Roboters angesteuert und dient zum automatisierten Umschalten zwischen Desinfektionslösung und VE-H₂O in einem Roboterprotokoll. Das Volumen des Schlauchsystems von der Vorratsflasche bis zur Nadelspitze beträgt 27 mL und muss zur Desinfizierung erst verdrängt werden, was etwa 10 Sekunden dauert.

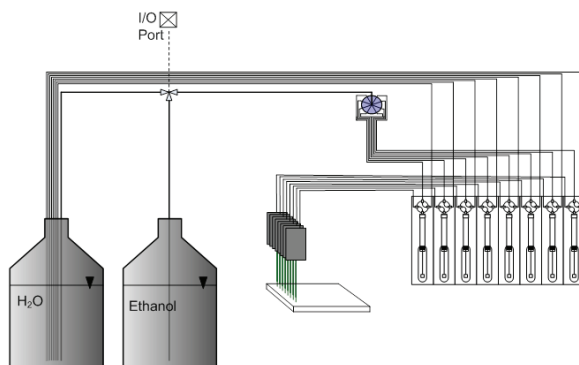


Abbildung 5.6: Sterilisation der Pipettenspitzen: Schema des Schlauchsystems des Pipettierroboters. Ein Wechsel zwischen den Systemflüssigkeiten Wasser und Ethanol erfolgt über ein automatisiertes Drei-Wege-Ventil. Dieses wird über den I/O-Port des Roboters von der Software WinPrep gesteuert.

Die sterilisierende Wirkung verschiedener Spülmethode wird getestet. Hierzu werden die Nadeln mit Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien kontaminiert, indem 1000 μL einer vitalen Bakteriensuspension ($\text{OD} = 5$) von *C. glutamicum* bzw. *E. coli* aufgesaugt und nach 5 Sekunden wieder abgegeben werden. Anschließend erfolgt entweder kein Spülschritt als Negativ-

Kontrolle (ohne Spülen), ein Spülschritt mit drei Pulsen von je 3000 µL Systemflüssigkeit je Spitze (H₂O Spülschritt, Dauer: 3 s), oder ein zusätzlicher Spülschritt mit 30 mL Desinfektionslösung (Dauer: 10 s) und ein weiterer Spülschritt mit 30 mL Wasser (Dauer: 10 s), um wieder Wasser im Schlauchsystem zu haben. Ein weiterer Ansatz mit einer Inkubationszeit von 8 h des mit Desinfektionslösung gefüllten Schlauchsystems dient als Positivkontrolle. Aus den so gereinigten Nadeln werden 50 µL der Systemflüssigkeit in 1 mL sterilem VE-H₂O aufgenommen und die koloniebildenden Einheiten (KBE) bestimmt.

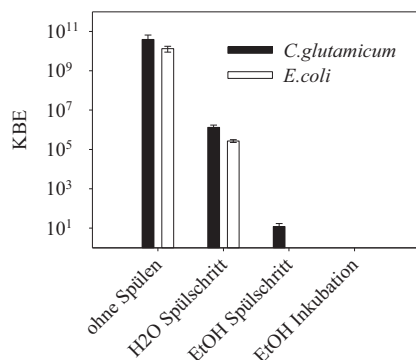


Abbildung 5.7: Sterilisation der Pipettenspitzen: Nach Aufsaugen von 1000 µL Kultursuspension (jeweils OD₆₀₀ = 5) und anschließender Reinigungsschritte werden Koloniebildende Einheiten (KBE) in 50 µL der direkt in den Nadeln angrenzenden Systemflüssigkeit überprüft.

Durch das Spülen mit der Desinfektionslösung (70% (v/v) EtOH) wird die Keimzahl in der Systemflüssigkeit um den Faktor 10⁶ bzw. 10⁵ reduziert. Bei einer Inkubationszeit von 8 h sind keine KBEs mehr messbar. Kontaminationen können bei unterschiedlichen Arbeiten auftreten, die, je nachdem, was für ein Arbeitsschritt folgt, verhindert werden müssen. Fünf relevante Szenarien und die dabei notwendige Dekontamination sind in Tabelle 5.3 aufgeführt.

Tabelle 5.3: Notwendige *Sterilizing-in-Place* (SIP) Maßnahmen zur Verwendung des Pipettierroboters für mikrobielle Arbeiten.

	<i>E. coli</i>	<i>C. glutamicum</i>
Vor der Ernte eines Wells für Enzymassay	Spülschritt (H ₂ O)	
Vor IPTG-Zugabe während einer Kultivierung	Spülschritt (EtOH)	
Vor der Medienpräparation/Animpfen der Hauptkultur	Spülschritt (EtOH)	Inkubation
Systemreinigung nach Benutzung	Inkubation (EtOH)	

Durch die Lagerung von abgeernteter Zellsuspension bei 4°C wird das Wachstum nahezu gestoppt, womit Kontaminationen hier kaum eine Rolle spielen. Bei der IPTG-Zugabe zu Kultivierungen mit verschiedenen Stämmen sollte eine Kreuzkontamination vermieden werden. Da die Zugabe in der Regel bei höheren Zellzahlen erfolgt, reicht es, einen EtOH-Spülschritt und keine Kontamination durchzuführen. Sind in allen Kavitäten gleiche Stämme enthalten, so ist eine Kreuz-Kontamination unkritischer als bei 48 verschiedenen Stämmen, wodurch auch vor und nach einer IPTG-Zugabe nur mit H₂O gespült werden braucht. Hingegen sollten vor Arbeiten, die für Kontaminationen sensitiv sind (Medienpräparation, Überimpfen von der Vor-zur Hauptkultur), die Stahlnadeln entsprechend der Ergebnisse sterilisiert werden.

5.2 VALIDIERUNG DER AUTOMATISIERTEN KULTIVIERUNGSPLATTFORM

Die neu aufgebaute Robotik-Anlage JUBOS soll für Arbeiten mit mikrobiellen Proteinproduzenten verwendet werden. Die wesentlichen Schritte mikrobieller Arbeiten sind die Medienerstellung, die Kultivierung, die Probenahme und die Analytik. Hierauf basierend wird folgend ein Workflow aus fünf MTP-basierten Hochdurchsatz-Methoden für mikrobielle Arbeiten dargestellt. Diese einzelnen Arbeitsschritte sind I) Medienerstellung, II) Kultivierung, III) Probenahme und Lagerung, IV) Zellabtrennung und V) Aktivitätsassay, die mit Hilfe der automatisierten Geräte (vgl. Abbildung 5.8) auf dem JUBOS durchgeführt werden. Da der Aktivitätsassay mitsamt vorheriger Zellabtrennung eine hinreichend beschriebene Standardmethode ist (Brockmeier et al. 2006a; Funke et al. 2003; Winkler and Stuckmann 1979), werden die Schritte I bis III in Kapitel 5.2.1 bis 5.2.3 näher untersucht. Das hierfür verwendete Modellsystem ist *C. glutamicum*, das Cutinase mit dem Signalpeptid NprE sekretiert.

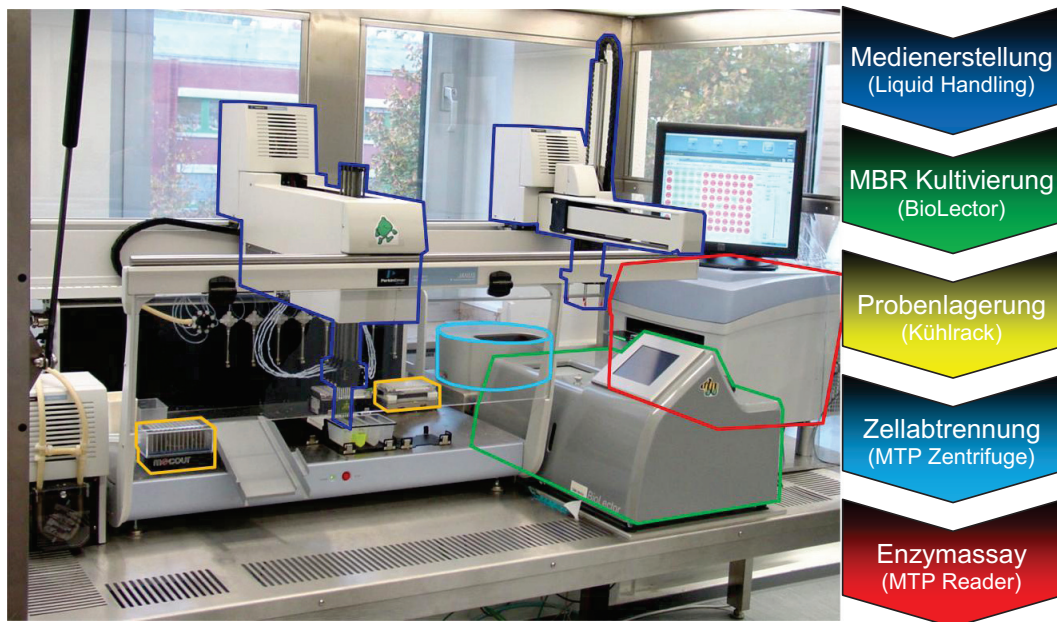


Abbildung 5.8: Automatisiertes Mikrokultivierungssystem: Umrandete Instrumente werden Arbeiten in einem Kultivierungs-Workflow zugeordnet (vgl. Farben). Dunkelblau: Pipettierroboter JANUS Integrator mit Varispan-und RailGripper-Arm (PerkinElmer), Grün: Mikrokultivierungssystem BIOLECTOR (m2p labs), Gelb: Kühladapter (Mecour), Hellblau: MTP-Zentrifuge IXION (Sias), Plattenphotometer ENSPIRE (PerkinElmer). Anlage ist in Laminar Flow Werkbank eingebaut (Clean Air), hier mit geöffneter Frontscheibe.

5.2.1 Validierung: Automatisierte Medienerstellung

Vor jeder Kultivierung werden Nährmedien mit Hilfe der acht Stahlnadeln des Varispan-Arms in die Kultivierungsgefäße pipettiert. Dieser Schritt kann entweder ein einfaches Verteilen eines einzigen Mediums sein (s. S. 43 Kapitel 4.5.1), oder aber ein Zusammenpipettieren aus verschiedenen Stocklösungen. Bei der Methodenvalidierung wird daher überprüft, ob die Medienerstellung aus mehreren Stocklösungen die gleichen Ergebnisse liefert wie die herkömmliche manuelle Vorgehensweise

Zur Durchsaterhöhung bei der Medienerstellung soll der Pipettierroboter JANUS verwendet werden. Neben den steriltechnischen Anforderungen (vgl. Kapitel 5.1.4) muss die Pipettiergenauigkeit in dem gewählten Volumenbereich gegeben sein. Herstellerangaben von 2% beziehen sich auf das Pipettieren von Wasser (PerkinElmer, Shelton/USA).

Beim Pipettieren von Flüssigkeiten mit höherer Viskosität wird bei Gebrauch von herkömmlichen Laborpipetten vom Experimentator meist intuitiv der Unterdruck zum Ansaugen besonders langsam aufgebaut. Entsprechendes Verhalten wird dem Pipettierroboter in substanzspezifischen „Performance Files“ hinterlegt. Diese Dateien definieren Pipettiereinstellungen und sind vom Benutzer für jeden Pipettierschritt wählbar. Die standardmäßig verwendete „Water“-Performance File wird generell für Wasser und verdünnte wässrige Lösungen verwendet. Im Rahmen dieser Arbeit wird für Flüssigkeiten höherer Viskosität die Performance-File „*High viscosity*“ erstellt. In diesen Einstellungen wird die Geschwindigkeit des Kolbenhubs im Vergleich zur „Water“-Einstellung halbiert und die Nadeln nach dem Ansaugen für 2 s in der Flüssigkeit gehalten. Auf diese Weise könnten sowohl stark viskose also auch Flüssigkeiten mit einer Viskosität von Wasser pipettiert werden. Da diese Prozedur bei einem Pipettiervolumen von 1 mL aber ca. 6 s länger dauert als bei der *Water*-Einstellung, wird sie nur für Flüssigkeiten mit höherer Viskosität verwendet. In diesem Versuch zählen hierzu die Ammoniumsulfat-Stammlösung mit $c = 200 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $\eta = 2.530 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ bei $T = 20^\circ\text{C}$ und die Glucose-Stammlösung mit $c = 400 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $\eta = 5.493 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ bei $T = 20^\circ\text{C}$ (Lide 2000).

Um die Eignung dieser Einstellungen für die robotergestützte Medienerstellung im mL-Maßstab zu bestätigen wird CG XII Minimalmedium aus verschiedenen Stocklösungen automatisiert erstellt (vgl. Tabelle 5.4). Die sterilen Lösungen Harnstoff, Phosphatquellen, MOPS pH-Puffer und Glucose werden manuell vorgemischt, jede Spurenelementlösung sowie Ammoniumsulfat werden jeweils als separate Stocklösungen zugegeben, wodurch insgesamt 12 Stocklösungen pipettiert werden. Ein ähnliches Pipettierprotokoll wird später in Kapitel 6.3 für die Untersuchung des Einflusses der einzelnen Spurenelemente benötigt.

Dieses automatisierte Vorgehen im mL-Maßstab wird mit einer manuellen Herstellung im L-Maßstab verglichen. Hierbei wird ein Standardprotokoll verwendet, in dem Stickstoffquellen, Phosphatquellen und MOPS pH-Puffer zu einer Arbeitslösung vorgemischt und gemeinsam autoklaviert werden. Beim späteren manuellen Pipettieren der Medien werden insgesamt 8 Stocklösungen verwendet (Tabelle 5.4). Je Methode werden sechs parallele *C. glutamicum* Kultivierungen mit je separater Medienpräparation untersucht.

Tabelle 5.4: Erstellung von CG XII Minimalmedium aus verschiedenen Stocklösungen. 8 Stocklösungen für die manuelle präparation im L Maßstab, 12 Stocklösungen für die automatisierte Präparation im mL Maßstab mit dem WinPrep-Protokoll 20110117_Heavymetal.mth.

	$c_{\text{End}} [\text{g}\cdot\text{L}^{-1}]$	$c_{\text{End}} [\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}]$	Manuell: $V_{\text{Stock,man}} [\text{mL}]$ für $V_{\text{end}} = 1000 \text{ mL}$	Automatisiert: $V_{\text{Stock,autom}} [\mu\text{L}]$ für $V_{\text{end}} = 1000 \mu\text{L}$
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	20	151.35	500	50
Harnstoff	0.313	5.21		500
KH_2PO_4	1	7.35		
K_2HPO_4	1	5.74		
MOPS	42	200.70		
Glucose	20	0.11	50	350
Wasser			450	
	$c [\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}]$	$c [\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}]$		
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	13.25	0.09	1	10
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	250	1.01	1	10
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	100	0.36	1	10
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	100	0.59		10
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1	$3.48 \cdot 10^{-03}$		10
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.313	$1.25 \cdot 10^{-03}$		10
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.02	$8.41 \cdot 10^{-05}$		10
Biotin	0.2	$8.19 \cdot 10^{-04}$	1	10
PCA	15	$9.73 \cdot 10^{-02}$	2	20

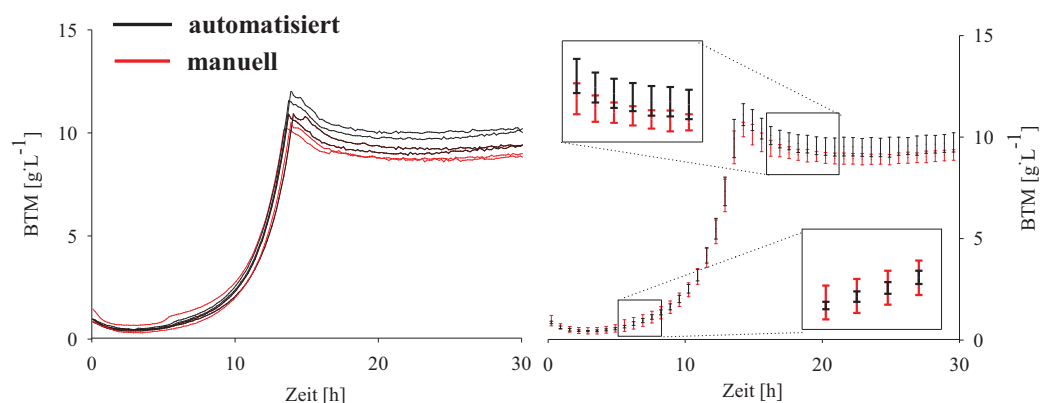


Abbildung 5.9: Automatisierte Medienerstellung: Kultivierungen von *C. glutamicum* in manuell (rot) erstelltem CG XII Medium aus 6 Stammlösungen und automatisiert (schwarz) erstelltem CG XII aus 12 Stammlösungen. Jeweilige Fehlerbalken entsprechen der Biomasse-Standardabweichung von sechs Replikaten.

Die relativen Abweichungen der Biotrockenmasse gemittelt über den gesamten Kultivierungsverlauf betragen 10% für die manuelle Erstellung und 7% für die automatisierte Erstellung. Man erkennt jedoch eine systematische Abweichung zwischen manueller und automatisierter Methode in der Stationärphase. Ein t-Tests mit Werten von $t = 17$ h weist jedoch keinen signifikanten Unterschied der beiden Mittelwerte nach (98%). Die miniaturisierte Medienerstellung im mL-Maßstab und der manuellen Medienerstellung im L-Maßstab führen also zu statistisch nicht unterscheidbaren Ergebnissen der Biotrockenmasse von *C. glutamicum*.

Die Ungenauigkeit des des Pipettierroboters beträgt zwischen 0.5% und 5%, abhängig von den pipettierten Volumina (Nealon et al. 2005). Obwohl bei der automatisierten Medienerstellung mehr Pipettierschritte als bei der manuellen Erstellung durchgeführt werden, führen diese Ungenauigkeiten nicht zu einem höheren Fehler der Biotrockenmassekonzentration. Demnach kann zukünftig der Pipettierroboter zur automatisierten Erstellung von CG XII basierten Medien aus 12 Stocklösungen verwendet werden.

Die Pipettierlisten mit den gewünschten Volumina der Stocklösungen können vom Pipettierroboter aus .csv-Dateien ausgelesen werden. Mit Hilfe dieser Methodik lassen sich Software-Tools z. B. zur statistischen Versuchsplanung einfach in Standard-Robotikmethoden einbinden, wodurch eine vollständige elektronische Handhabung gewährleistet ist. Diese Technik wird in der Medienoptimierung, die in Kapitel 6.3 beschrieben ist, erfolgreich angewendet.

5.2.2 Validierung der Kultivierung im BioLector

Die Kultivierung in Mikrotiterplatten wird in dieser Arbeit weitgehend im BioLector durchgeführt. Bei der Inbetriebnahme des BioLectors wird die Online-Analytik kalibriert, sowie die Skalierbarkeit der Ergebnisse durch einen Vergleich mit Modellbioreaktoren gezeigt.

Kalibrierung der Biomasse Analytik

In herkömmlichen Modell-Bioreaktorkultivierungen werden für die Biomassedaten eines Prozessverlaufs wiederholt Proben entnommen und die Biotrockenmasse (BTM) gravimetrisch bzw. die optische Dichte (OD) photometrisch vermessen. Hierzu ist meist ein Probenvolumen > 1 mL notwendig (vgl. Kapitel 4.4). Die Entnahme von einer entsprechend großen Probenmenge aus einer Flowerplate-Kultivierung ($V_L = 1$ mL) ist nur durch die Ernte der gesamten Kultivierung machbar, was einer Endpunktbestimmung gleichkommt. Der BioLector verfügt aber über eine Funktion zur optischen Bestimmung der Biomassekonzentration, indem durch den transparenten

Boden von geschüttelten Flowerplates reflektiertes Licht ($\lambda = 620 \text{ nm}$) als sog. Backscatter (BS) gemessen wird (Samorski et al. 2005). Bei der Aufnahme des Signals muss das Schütteln der Flowerplate nicht gestoppt werden, was eine nicht-invasive Online-Analytik bedeutet. Um bioprozessrelevante Daten aus diesem Online-Signal zu generieren, wird der BS mit der BTM kalibriert. Drei Referenzstämme (*C.glutamicum*, *B.subtilis*, *E.coli*) werden untersucht. Die BTM und der BS von Kultursuspensionen aus drei unterschiedlichen Bioreaktor-Systemen wird wie in Kapitel 4.4 bestimmt.

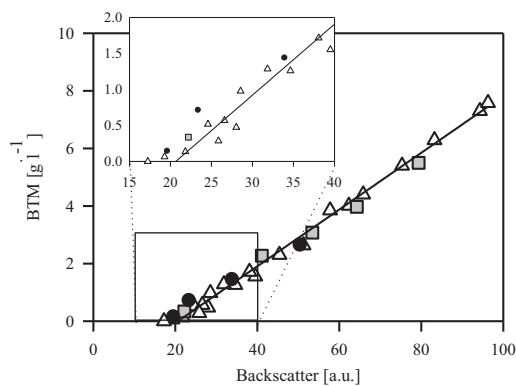


Abbildung 5.10: Kalibrierung des Backscatter-Signals von *E. coli*: BL21 mit pet28a Leerplasmid, $T = 37^\circ\text{C}$, Willms-Reuss Minimalmedium (s. S. 36 ff). Zellmaterial:

- Bioreaktor-Kultivierung mit $pO_2 > 30\%$, Rührer zwischen 400 und 1200 min^{-1} geregelt. $pH = 7$, Probenahme für BS und BTM 1x pro Stunde.
- △ Verdünnungsreihe aus Schüttelkolben-Kultivierung (+ 21 gL^{-1} MOPS). Zellen in der späten exponentiellen Phase geerntet und für die Erstellung einer Verdünnungsreihe Willms-Reuss Medium (ohne Glucose) verwendet.
- BioLector-Kultivierung (+ 21 gL^{-1} MOPS). 24 parallele Kultivierungen zu 6 verschiedenen Zeitpunkten in der exponentiellen Phase geerntet (3 Replika). BS-Messung Online, BTM aus 0.5 mL Suspension gemessen.

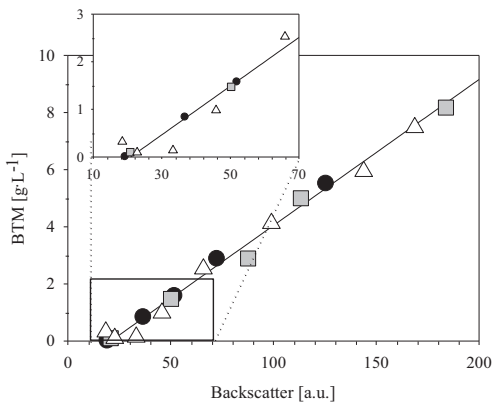


Abbildung 5.11: Kalibrierung des Backscatter-Signals von *C. glutamicum*: ATCC 13032 mit pEKEX2 Leerplasmid, CG XII Minimalmedium (s. S. 36 ff), $T = 30^\circ\text{C}$. Zellmaterial:

- Bioreaktor-Kultivierung mit $pO_2 > 30\%$, Rührer zwischen 400 und 1200 min^{-1} geregelt. $pH = 7$, Probenahme für BS und BTM 1x pro Stunde.
- △ Verdünnungsreihe aus Schüttelkolben-Kultivierung (+ 42 gL^{-1} MOPS). Zellen in der späten exponentiellen Phase geerntet. Für die Erstellung einer Verdünnungsreihe CG XII-Medium (ohne Glucose) verwendet.
- BioLector-Kultivierung (+ 42 gL^{-1} MOPS). 24 parallele Kultivierungen zu 6 verschiedenen Zeitpunkten in der exponentiellen Phase geerntet (3 Replika). BS-Messung Online, BTM aus 0.5 mL Suspension gemessen.

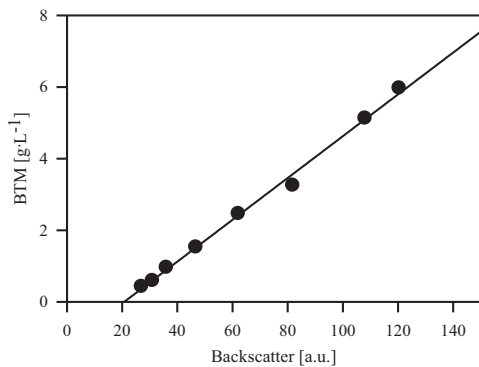


Abbildung 5.12: Kalibrierung des Backscatter-Signals von *B. subtilis*: TEB1030 mit pBSMul Leerplasmid, MVen3 Komplexmedium (s. S. 36 ff), T = 30°C. Zellmaterial:

● Bioreaktor-Kultivierung mit $pO_2 > 30\%$, Rührer zwischen 400 und 1200 min^{-1} geregelt. pH = 7, Probenahme für BS und BTM 1x pro Stunde.

Die erste Sorte Kultursuspension stammt aus dem Kultivierungsverlauf einer 1 L Bioreaktorkultivierung. Für die zweite Kultursuspension werden parallel wachsende 1 mL Flowerplate-Kultivierungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet. Abweichend vom Protokoll aus Kapitel 4.4 (Bestimmung der Biotrockenmasse) wird hier statt von 1 mL die Biomasse von 0.5 mL getrocknet und gewogen. Die dritte Biomasseart stammt aus einem Zeitpunkt einer Schüttelkolbenkultur (exponentiell wachsend), die durch Zentrifugation aufkonzentriert und mit dem jeweils verwendeten Medium in Reihe verdünnt wird. Die frei wählbare Signalverstärkung (Gain) des BioLectors wird hierbei auf Gain = 20 a.u. eingestellt. (Eine Veränderung der Signalverstärkung ist im Anhang auf Seite 145 aufgeführt.)

Für *B. subtilis* werden nur Proben einer Bioreaktorkultivierung vermessen. Da aber das BS-BTM-Verhältnis von *C. glutamicum* und *E. coli* keine Sensitivität auf die drei Kultivierungsarten zeigt, ist ein Einfluss auf *B. subtilis* unwahrscheinlich.

Alle drei Bakterienarten zeigen ein lineares Verhältnis von BS und BTM in dem untersuchten Bereich (Abbildung 5.10 bis Abbildung 5.12). Dieser lineare Bereich liegt zwischen 0.2 g·L^{-1} und mindestens 9 g·L^{-1} bei *C. glutamicum*, mindestens 8 g·L^{-1} bei *E. coli* und mindestens 6 g·L^{-1} bei *B. subtilis*. Höhere Zelldichten von *C. glutamicum* zeigen bei 35 g·L^{-1} ein oberes Limit des linearen Bereichs (hier nicht dargestellt).

Für eine lineare Regression werden alle gemessenen Datenpunkte in dem dargestellten Bereich verwendet. Die Regressionsparameter sind in der folgenden Tabelle 5.5 aufgelistet. Alle drei Geradengleichungen sind mit einer Regressionsgüte $R^2 = 0.99$ bestimmt, womit ein linearer Zusammenhang zwischen BTM und BS besteht.

Tabelle 5.5: BTM-BS-Kalibrierung: Werte der Regressionsgeraden von *E. coli*, *C. glutamicum*, *B. subtilis* anhand der auf Seite 64 dargestellten BS-BTM Wertepaare.

$\text{BTM} = \text{BS} \cdot m + y_0$	$m [\text{g}_{\text{BTM}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{BS}^{-1}]$	$y_0 [\text{g}_{\text{BTM}} \cdot \text{L}^{-1}]$	R^2
<i>E. coli</i> ^{*1}	0.099 ± 0.001	-2.03 ± 0.09	0.99
<i>C. glutamicum</i> ^{*2}	0.051 ± 0.001	-1.07 ± 0.11	0.99
<i>B. subtilis</i> ^{*3}	0.058 ± 0.002	-1.21 ± 0.11	0.99

*1: *E.coli* BL21 mit pet28a Plasmid *2 *C.glutamicum* ATCC 13032 mit pEKEX2 Plasmid. *3: *B.subtilis* TEB1030 mit pBSMul Plasmid.

Die Parameter m und y_0 der linearen Regression von *E. coli* unterscheiden sich deutlich (Faktor 2) von den Parametern der Regressionen von *B. subtilis* und *C. glutamicum*. Der Y-Achsenabschnitt y_0 repräsentiert das Grundrauschen des Mediums bei $\text{BTM} = 0$ und ist damit nicht auf die Bakterienart zurückzuführen. Die Steigung m hingegen, also das Verhältnis zwischen BTM und BS, ist sehr wahrscheinlich durch die Bakterienzellen bedingt. Dieser Wert beträgt bei den Gram-positiven Bakterienarten *C. glutamicum* und *B. subtilis* 0.051 bzw. 0.058 $\text{g}_{\text{BTM}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{BS}^{-1}$. Die Steigungen m der Gram-negativen *E. coli*-Zellen sind hingegen mit 0.099 $\text{g}_{\text{BTM}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{BS}^{-1}$ etwa doppelt so groß.

Vergleichswerte der drei Stämme für eine Kalibrierung zwischen BS und BTM sind in der Literatur bisher nicht veröffentlicht. Meist werden aber Kalibrierungsdaten zwischen OD und BTM aufgeführt, wie z.B. bei Bolten et al. (2007). Die Autoren nennen ein Verhältnis von BTM zu OD für *C. glutamicum* von $m = 0.353 [\text{g}_{\text{BTM}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{OD}^{-1}]$, für *B. subtilis* von $m = 0.289 [\text{g}_{\text{BTM}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{OD}^{-1}]$ und für *E. coli* von $m = 0.439 [\text{g}_{\text{BTM}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{OD}^{-1}]$. Diese Unterschiede, wie auch die Unterschiede zwischen den drei BS und BTM-Kalibrationen sind wahrscheinlich auf morphologische Unterschiede zurückzuführen. Während der Gram-positive *E. coli* den höchsten m -Wert aufweist, haben die Gram-negativen *B. subtilis* und *C. glutamicum* die niedrigeren m -Werte. Hierdurch können nicht nur Abweichungen zwischen Gram-positiven und Gram-negativen Zellen entstehen, sondern z.B. auch zwischen Zellen aus der Stationärphase und der exponentiellen Phase, oder bei veränderten Salzkonzentrationen nach einem Wechsel des Mediums.

Die hier gezeigten Regressionen dienen also nur zur Kalibrierung unter exakt den hier verwendeten Bedingungen: Exponentielles Wachstum, Füllstand 800-1000 μL , verwendete Medien wie beschrieben. Bei einem Wechsel auf ein anderes Medium oder andere Stämme muss die Ka-

librierung erneut durchgeführt werden, was ebenfalls gängige Praxis für OD-BTM Kalibration ist (Bolten et al. 2007; Fieschko et al. 1985; Hwang and Feldberg 1990).

Online-Analytik zur Messung fluoreszierender Proteine

Die optische Analytik des BioLectors hat über Backscatter-Messungen hinaus ebenfalls die Möglichkeit, Fluoreszenz-Signale von parallelen Kultivierungen aufzunehmen. Im Folgenden werden die Daten eines Fusionsproteins (Krauss et al. 2009) aus einer blau fluoreszierender Domäne (FbFP, bzw. LovA) und Lipase A von *Bacillus subtilis* (BSLA) dargestellt. Dieses Fusionsprotein besitzt bei korrekter Faltung sowohl fluoreszierende als auch enzymatische Eigenschaften.

Das jeweilige Gen ist auf einem pet28a Vektor codiert und wird in *E. coli* BL21 exprimiert. Wie bei der Korrelation zwischen Biotrockenmasse und Backscatter werden drei verschiedene Ausgangsmaterialien verwendet: Proben aus einem Bioreaktor, abgeerntete Kultivierungen in der Flowerplate sowie eine Verdünnungsreihe aus konzentriertem Zellmaterial. Fluoreszenzwerte werden in einer Flowerplate im BioLector bei $V = 800 \mu\text{L}$ und 1200 min^{-1} aufgenommen. Der Zellaufschluss und die Bestimmung der Aktivitätsassay werden nach dem Protokoll in Kapitel 4.4 bestimmt.

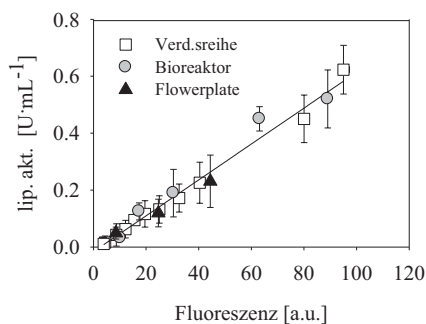


Abbildung 5.13: Korrelation zwischen lipolytischer Aktivität und Fluoreszenz des Fusionsproteins FbFP-BSLA. Produktionswirt: *E. coli* BL21, Plasmid: pet28a. Medium: Willms-Reuss Medium mit 50 mg L^{-1} Kanamycin, Proteinexpression induziert von Beginn an mit 1 mM IPTG. $V = 800 \mu\text{L}$ in Flowerplate bei $n = 1200 \text{ min}^{-1}$. Bioreaktor in 1 L Batchkultur, $p\text{O}_2 > 30\%$, $\text{pH} = 7$; $T = 37^\circ\text{C}$. Die lipolytische Aktivität des Rohextrakts wurde mit dem pNPP-Assay vermessen.

Allen drei Zellmaterialien weisen eine ähnliche Korrelation der lipolytischen Aktivität EA zur Fluoreszenz FL auf. Da diese beide Messgrößen annähernd linear korrelieren, kann mithilfe der Fluoreszenz-Messung des BioLectors auf die biotechnologisch relevante Größe der Enzymaktivität des Fusionsproteins geschlossen werden.

Validierung mittels Scale-up

In der mikrobiellen Bioprozessentwicklung werden im Allgemeinen STRs (Stirred Tank Reactors) als Bioreaktoren verwendet. Sie sind weitreichend charakterisiert, gut zu bilanzieren und haben durch ihre Skalierbarkeit breite Akzeptanz in der frühen Bioprozessentwicklung als auch im Produktionsmaßstab gefunden. Die Skalierbarkeit von MBRs zur STRs ist hingegen erst seit wenigen Jahren Gegenstand der Forschung (Islam et al. 2008; Kensy et al. 2009a; Marques et al. 2010) und wird somit auch in dieser Arbeit für die verwendeten Organismen überprüft. Im Folgenden werden Ergebnisse aus Kultivierungen in etablierten STRs mit den in dieser Arbeit beschriebenen Kultivierungen im BioLector verglichen.

Scale-up: BioLector (1 mL) im Vergleich zu Labor-Bioreaktor (1 L)

Da *C. glutamicum* aufgrund der festen Zellwand als scherunempfindlich gilt (Eggeling and Bott. 2005), werden bei der Regelung des pO_2 , anders als z.B. bei filamentöse Pilzen, keine negativen Effekte durch hohe Rührergeschwindigkeiten, bzw. durch die an den Strombrechern der geschüttelten Flowerplate entstehenden Scherkräfte erwartet. Als Scale-up Kriterium wird ein regeltechnischer Ansatz verwendet (Riesenberg et al. 1990), um den Sauerstoffpartialdruck über 30% zu halten.

In einer BioLector-Kultivierung von *C. glutamicum* in CG XII mit 20 gL^{-1} Glucose sinkt die Sauerstoffsättigung bei einer Schüttelfrequenz von 1200 min^{-1} und 1 mL Füllvolumen nicht unter 30%. Hier ist also keine Regelung von z.B. der Schüttelfrequenz notwendig. Diese Einstellung entspricht laut Herstellerangaben einem OTR_{Max} von $80.06 \text{ mmolL}^{-1}\text{h}^{-1}$.

In der 1 L Bioreaktorkultivierung (DasGip) wird der $pO_2 = 30\%$ mit einer Rührerkaskade zwischen 400 min^{-1} und 1200 min^{-1} auf über 30% geregelt. Ist die maximale Rührerdrehzahl erreicht, wird mit einer sich anschließenden Kaskade die Begasungsrate zwischen 1 Lmin^{-1} und 2 Lmin^{-1} geregelt.

Es werden zwei parallele 1 L Batchkultivierungen in DasGip Bioreaktoren (s. Kapitel 4.5) mit Cutinase produzierendem *C. glutamicum* (Signalpeptid: NprE) angeimpft und je eine 5 mL Probe pro Stunde entnommen, aus dem BTM, lipolytische Aktivität und Glucosekonzentration bestimmt werden.

Die gleiche Vorkultur wird zum Beimpfen von 48 parallelen Ansätzen einer Flowerplate verwendet. Komplette Kultivierungsansätze der Flowerplate werden zu unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet. Backscatterwerte werden mit der Kalibrier-Geradengleichung (s. Kap. 5.2.2) in

BTM-Konzentrationen umgerechnet. Aus den zellfreien Überständen der entnommenen Flowerplate-Kultivierungen wird die lipolytische Aktivität und die Glucosekonzentration (s. Kapitel 4.4) bestimmt. Die jeweiligen Prozessverläufe sind in Abbildung 5.14 dargestellt.

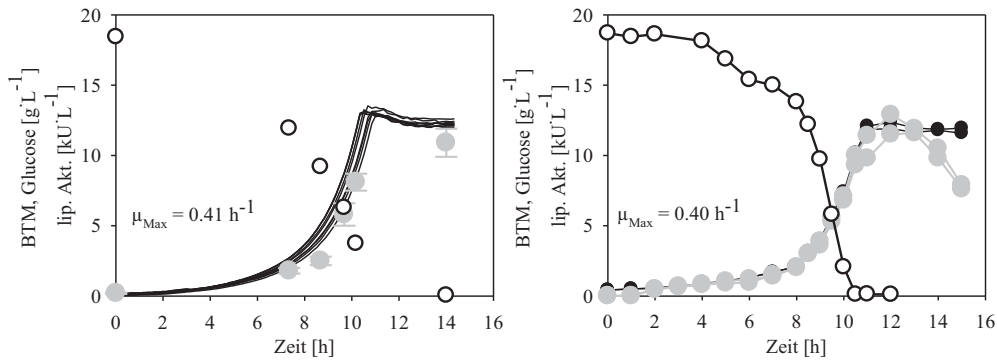


Abbildung 5.14: Vergleich von 6 parallelen Flowerplate-Kultivierung im BioLector (links) mit 1 L Bioreaktoren in Duplikaten (rechts). Schwarze lle Kultivierungen wurden aus derselben Vorkultur angeimpft. Stamm: *C. glutamicum* pEKEX2::cutinase-nprE. Medium: CGXII, 20 g·L⁻¹ Glucose, 0.5 mM IPTG, im BioLector: MOPS-gepuffert, V = 1 mL, n = 1200 min⁻¹.

Die Biotrockenmassekonzentrationen bzw. die Backscatter-Werte der Ansätze des BioLectors haben einen statistischen Fehler von 8 %. Dieser liegt somit in der Größenordnung der vom Hersteller angegebenen relativen Abweichung des Backscattersignals von 10%. Der Wachstumsverlauf im BioLector entspricht dem der 1 L Bioreaktor-Kultivierungen (schwarze Punkte in Abbildung 5.14), was sich in ähnlichen Wachstumsraten von $\mu_{\text{Max}} = 0.41 \text{ h}^{-1}$ bzw. 0.40 h^{-1} (mit jeweils $\Delta\mu = 0.02$) und der gleichen Biomasseausbeute von $Y_{X/S} = 0.60 \pm 0.05$ äußert.

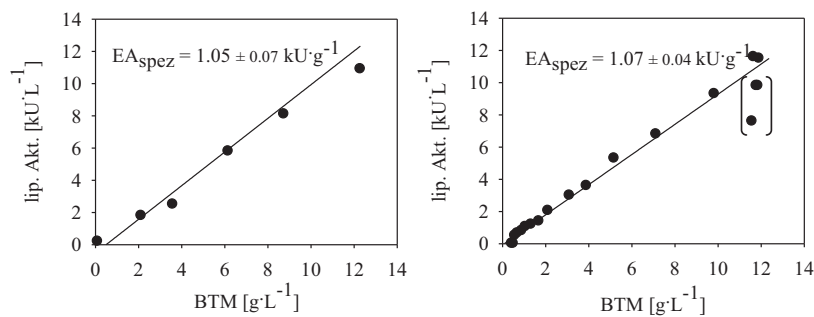


Abbildung 5.15: Vergleich der Cutinaseproduktion von *C. glutamicum* im BioLector (links) und 1 L Bioreaktor (rechts). Berechnung der spezifischen Aktivität EA_{Spez} mittels linearer Regression der lipolytischen Aktivität über Biotrockenmasse. Eingeklammerte Werte (rechts) stammen aus der späteren Stationärphase des Bioreaktors, weisen hier kein wachstumsgekoppeltes Verhalten auf und werden bei der Regression nicht berücksichtigt.

Die sekretorische Cutinaseproduktion (graue Punkte in Abbildung 5.14) hat im BioLector und im 1 L Bioreaktor in der exponentiellen und frühen Stationärphase einen wachstumsgekoppelten Verlauf. Hierdurch lässt sich in diesem Bereich die lipolytische Aktivität im Überstand als lineare Funktion der Biotrockenmasse ausdrücken (vgl. Formel 16, Seite 20). Die biomassespezifische Aktivität EA_{Spez} [$\text{kU} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1}$] ist bei dieser Auftragung die Steigung der linearen Trendlinie in Abbildung 5.15. Anhand EA_{Spez} (Steigung in Abbildung 5.15) ist zwischen dem BioLector und dem 1 L Bioreaktor kein erheblicher Unterschied in der Produktbildung feststellbar. Der statistische Fehler von EA_{Spez} im BioLector bzw. im Bioreaktor ist mit $\Delta c_{\text{Spez}} = 0.07 \text{ kU} \cdot \text{L}^{-1}$ bzw. $0.04 \text{ kU} \cdot \text{g}^{-1}$ höher, als der Unterschied der beiden c_{Spez} -Mittelwerte von BioLector und Bioreaktor ($EA_{\text{Spez}} = 1.05 \text{ kU} \cdot \text{g}^{-1}$ bzw. $1.07 \text{ kU} \cdot \text{g}^{-1}$). Im BioLector ist also nicht nur die Biomassebildung eines Bioreaktors reproduzierbar, sondern auch die Bildung sekretorischer Proteine.

So wie hier dargestellt werden drei weitere Stämme in beiden Reaktorsystemen untersucht. Darunter zwei Stämme mit anderen Signalpeptiden (YwmC, YpjP) und eine Negativkontrolle (Leervektor). Bedingt durch diese Signalpeptide ergibt sich eine Abstufung der spezifischen Aktivität EA_{Spez} .

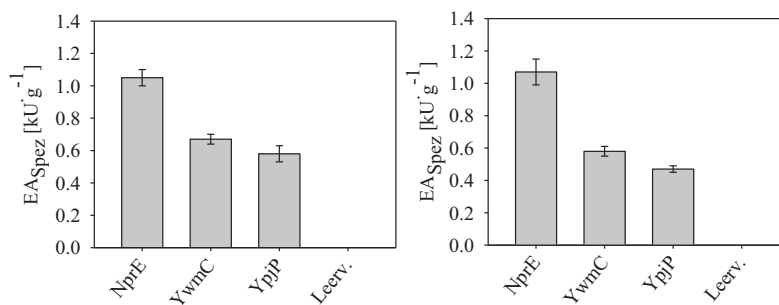


Abbildung 5.16: Vergleich der Produktbildung im BioLector (links) und 1 L Bioreaktor (rechts). Untersuchung von drei weiteren Stämmen mit unterschiedliche Signalpeptiden YwmC, YpjP und einem Leervektor.

Die Produktbildung dieser Stämme ergibt im 1 L Bioreaktor eine ähnliche Abstufung im Vergleich zu den Ergebnissen aus dem BioLector (Abbildung 5.16). Verschiedene Cutinaseproduzenten lassen sich im BioLector also genauso unterscheiden, wie es mit herkömmlichen Bioreaktorkultivierungen möglich ist, was ein entscheidender Vorteil in der später beschriebenen Stammauswahl im MBR-System BioLector ist.

Kensy et al. (2009a) beschreibt den Scale-up von *Hansenula polymorpha* und *E. coli* aus dem BioLector in einen 1.4 L anhand eines konstanten k_{La} in den Bioreaktor. Scale-up Versuche von phänotypisch unterschiedlichen Produzenten einer einzigen Organismenart, wie sie bei einem Stammscreening auftreten, wurden dabei aber nicht untersucht.

Scale-up: Labor-Bioreaktor (1 L) auf halbtechnischen Bioreaktor (20 L)

In einer 20 L STR Kultivierung (Chemap, s. S. 44, Kapitel 4.5.3) wird der gleiche Stamm wie im BioLector und Laborbioreaktor untersucht, jedoch angewachsen in einer anderen Vorkultur. Das Kriterium zur Maßstabsvergrößerung ist wie auch im 1 L Bioreaktor eine pO_2 -Regelung über 30% Luftsättigung. Dieser Wert wird anhand der Rührerdrehzahl, der Begasungsrate und dem Überdruck geregelt. Manuell werden bei bereits maximaler Rührerdrehzahl nach einem Absinken des pO_2 unter 50% die Begasung und der Überdruck auf konstante Werte erhöht Tabelle 5.6.

Tabelle 5.6: Eingestellte Parameter beim Scale-up mit dem Kriterium des Sauerstoffpartialdrucks > 30%.

	DasGip 1 L	Chemap 20 L
Flüssigkeitsvolumen V_L	1 L	20 L
Reaktorvolumen V_R	1.5 L	30 L
Rührer	Geregelt von 400 bis 1200 min^{-1}	Geregelt von 200 bis 800 min^{-1}
Begasung	Geregelt von 60 bis 120 L h^{-1}	Manuell: 850, 1200, 1800 L h^{-1}
Überdruck	Ungeregelt	Manuell: 0.2; 0.5 bar

Der Unterschied beider Systeme zum 20 L Bioreaktor fiel hingegen deutlicher aus: Zwar erreicht die Biomasse mit $Y_{X/S} = 0.60 \pm 0.03$ einen ähnlichen Ausbeutekoeffizienten wie in den 1 L Bioreaktoren. Die spezifische Wachstumsrate im 20 L System betrug allerdings nur $\mu = 0.27 \text{ h}^{-1}$. Ebenso ist die spezifische Aktivität EA_{Spez} im 20 L Reaktor um etwa 15 % niedriger verglichen mit dem 1 L Reaktor.

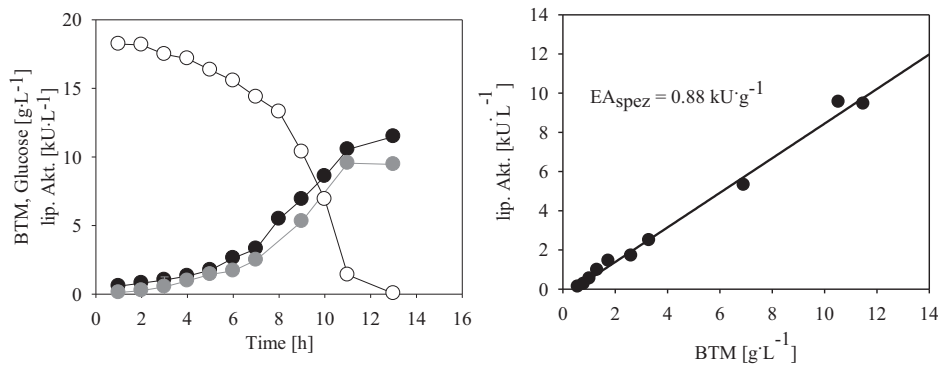


Abbildung 5.17: Scale-up in den 20 L Maßstab. Links: Prozessverlauf Cutinaseproduktion von *C. glutamicum* (SP: NprE). Rechts: Wachstumsgekoppelte Produktbildung und Berechnung der spezifischen Aktivität EA_{Spez} .

Bei diesem Scale-up Versuch ist ein Einfluss des Inokulums nicht ausgeschlossen, da der Bio-Lector und die 1 L Bioreaktoren aus derselben Vorkultur angeimpft werden, der 20 L Reaktor aber an einem anderen Tag und entsprechend mit einer anderen Vorkultur. Der Einfluss der Vorkultur wird ebenfalls durch eine zweite 20 L Kultivierung bestätigt. Hier wird anhand einer Probe am Ende der Batchphase ein $EA_{\text{Spez}} = 1.02 \text{ kU} \cdot \text{L}^{-1}$ bestimmt, was wiederum dem Wert im 1 L Laborbioreaktor entspricht. Die Streuung bedingt durch biologische Parameter ist also mindestens genauso hoch, wie die Streuung bedingt durch die Maßstabvergrößerung.

Ein reproduzierbarer Scale-up der Proteinproduktion in *E. coli* von 7 mL (μ 24) über 7.5 L hin zu 75 L (Islam et al. 2008) ist bei zu niedrigem Sauerstoffeintrag nicht möglich. Anders als *C. glutamicum* reagiert *E. coli* auf den Stress einer Sauerstofflimitation mit vermehrter Acetat-Sekretion, wodurch eine inhomogene Sauerstoffversorgung in großen Reaktoren einen größeren Einfluss auf *E. coli* als auf *C. glutamicum* haben könnte. Dass der Einfluss der Maßstabsvergrößerung von der biologischen Variabilität nicht zu unterscheiden ist, muss also bei anderen Organismen wie *E. coli* nicht der Fall sein. Scale-up Versuche über verschiedene Maßstäbe sollten daher ein fester Bestandteil der MBR-gestützten Bioprozessentwicklung sein.

5.2.3 Validierung: Probenahme und Lagerung

Während einer BioLector-Kultivierung auf der automatisierten Anlage können vom Pipettierroboter Kultursuspensionen aus MTP-Wells abgeerntet und später z.B. mittels Aktivitätsassays untersucht werden. Zur Lagerung der Zellsuspension auf dem Roboterdeck steht ein Deepwell Plate (DWP)-Adapter verbunden mit einem Umwälzkühler zu Verfügung.

In diesem Ergebnisteil wird der Einfluss des wiederholten Pausierens des BioLectors während der Probenahme überprüft. Desweiteren wird die Stabilität des in dieser Arbeit verwendeten Modellproteins Cutinase bei den entsprechenden Lagerungsbedingungen bestimmt.

Wenn automatisiert Proben aus dem BioLector entnommen werden, wird die Klappe der Inkubationskammer geöffnet und das Schütteln gestoppt. Ohne die Durchmischung der Kultursuspension ist der Sauerstoffeintrag stark vermindert. Die Temperatur in der geöffneten Inkubationskammer sinkt auf Umgebungstemperatur. Um den Effekt einer wiederholten Probenahme auf *C. glutamicum* zu überprüfen, wird 2-mal pro Stunde das Schütteln für 30 s unterbrochen und die Klappe geöffnet.

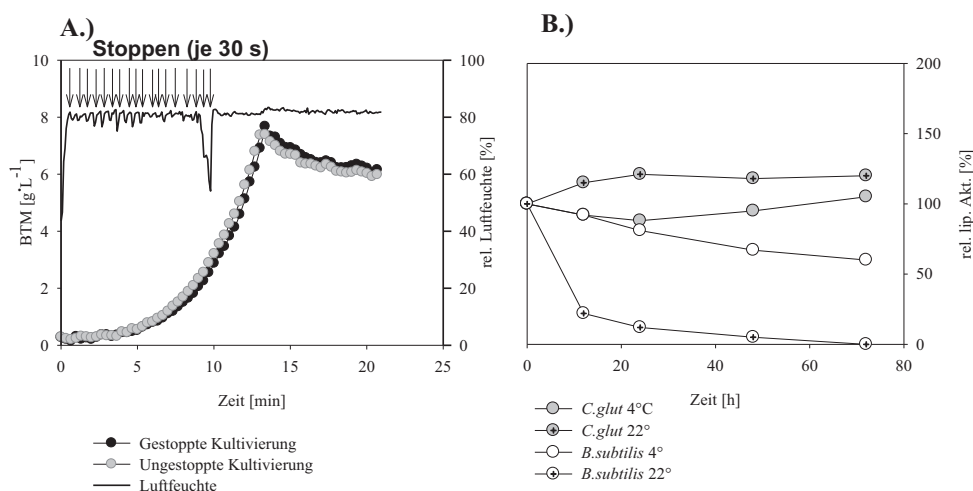


Abbildung 5.18: Einfluss der Probenahme und Lagerung: A.) Vergleich von einer Kultivierung mit Unterbrechungen (schwarz) und ohne Unterbrechungen (grau). Die Luftfeuchte ist Maß für die kontrollierten Bedingungen in der Inkubationskammer, Pfeile markieren die Zeitpunkte der Öffnungen. B.) Cutinase enthaltende Bakteriensuspensionen von *B. subtilis* und *C. glutamicum* gelagert bei verschiedenen Temperaturen.

Es ist kein erheblicher Unterschied zwischen der immer wieder gestoppten Kultivierung und einer Kontrollkultivierung ohne Stopps feststellbar (Abbildung 5.18 A). Bei Screening-Experimenten kann also eine Ernte einzelner Kultivierungen erfolgen, ohne dass die übrigen in ihrem Wachstum beeinflusst werden. Einen ähnlichen Validierungsschritt veröffentlichten Zimmermann und Rieth (2007) für eine MTP-Kultivierung von *S. cerevisiae* in einer Roboterplattform. Ein wiederholter Transport der MTP aus dem Inkubator zum Platerreader hat bei Zimmermann und Rieth keinen Einfluss auf die restlichen Kultivierungen in der MTP. Bei einem Wechsel der Organismus sollten entsprechende Versuche wiederholt werden.

Eine weitere Verfälschung der Ergebnisse könnte durch den Abbau oder Inaktivierung der Produkte in entnommenen und auf dem Roboterdeck gelagerten Zellsuspensionen stattfinden. Der Einfluss der Lagerungszeit sollte dabei so gering wie möglich gehalten werden, da am Ende alle zu unterschiedlichen Zeitpunkten abgeernteten Suspensionen parallel weiter verarbeitet werden sollen. Um diesen Einfluss zu untersuchen, wird NprE-Cutinase von *C. glutamicum* und *B. subtilis* im Schüttelkolben in CG XII bzw. LB Medium produziert. Die Zellsuspension wird in 50 mL Reaktionsgefäßen bei unterschiedlichen Temperaturen gelagert und alle 12 h bzw. alle 24 h Proben für Aktivitätsassays entnommen. Die Anfangsaktivität wird auf 100% normiert (Abbildung 5.18, B.). Cutinase aus dem Überstand von *C. glutamicum* erweist sich als stabiler als das gleiche Enzym produziert mit *B. subtilis*. Die Cutinaseaktivität in der *B. subtilis*-Zellsuspension beträgt bei Raumtemperatur (22°C) nach 12 h nur noch 22%, nach 24h nur noch 12% der ursprünglichen Cutinaseaktivität. Durch eine Kühlung (Geschwindigkeit des Wärmeübertrags s. Anhang auf S. 146) kann diese schnelle Inaktivierung verlangsamt werden. So ist bei 4°C gelagerten *B. subtilis* Suspensionen nach 12 h noch 93% und nach 24h noch 81% Cutinaseaktivität messbar. Die Cutinaseaktivität in den *C. glutamicum*-Suspensionen bleibt unter gleichen Bedingungen nahezu konstant ($\pm 15\%$).

B. subtilis ist für die Sekretion nativer Proteasen bekannt (May and Elliott 1968), *C. glutamicum* hat hingegen eine sehr geringe Anzahl sekretierter, hydrolytischer Enzyme (Date et al. 2006; Watanabe et al. 2009). Daher ist es wahrscheinlich, dass die Cutinase von nativen *B. subtilis* Proteasen degradiert wird. Die ungewünschten Lagerungseffekte bei 22°C können durch eine reduzierte Temperatur vermindert werden. Eine Kühlung entnommener Proben auf dem Roboterdeck ist also notwendig. Da die Proteinstabilität von dem Protein selber und den verwendeten Kultivierungsbedingungen (Medium, Stamm) abhängt, muss ein solcher Stabilitätstest für jeden neuen Produktionsprozess durchgeführt werden.

6 HOCHDURCHSATZOPTIMIERUNG DER PROTEINPRODUKTION

Im vorherigen Kapitel 5.2 ist die Anlagensvalidierung anhand der Cutinaseproduktion v.a. mit *C. glutamicum* dargestellt. Soll hingegen der Produktionsprozess eines anderen Proteins optimiert werden, sollten in Vortests z.B. Versuche zur Lagerungsstabilität wiederholt werden. Werden daneben andere Produktionswirte (wie z.B. *B. licheniformis* oder *P. putida*) oder andere Medien (Minimalmedien, Komplexmedien) verwendet, so muss die Kalibrierung der Online-Analytik wiederholt werden. Die Maßstabsvergrößerung als wesentlicher Schritt der wirtschaftlichen Proteinproduktion steht nach wie vor am Ende einer Entwicklungskette von Optimierungsschritten. Die folgenden Kapitel beinhalten die Entwicklung solcher Optimierungsschritte mit Hilfe des in den letzten Kapiteln dargestellten MBR-Systems (JuBOS)

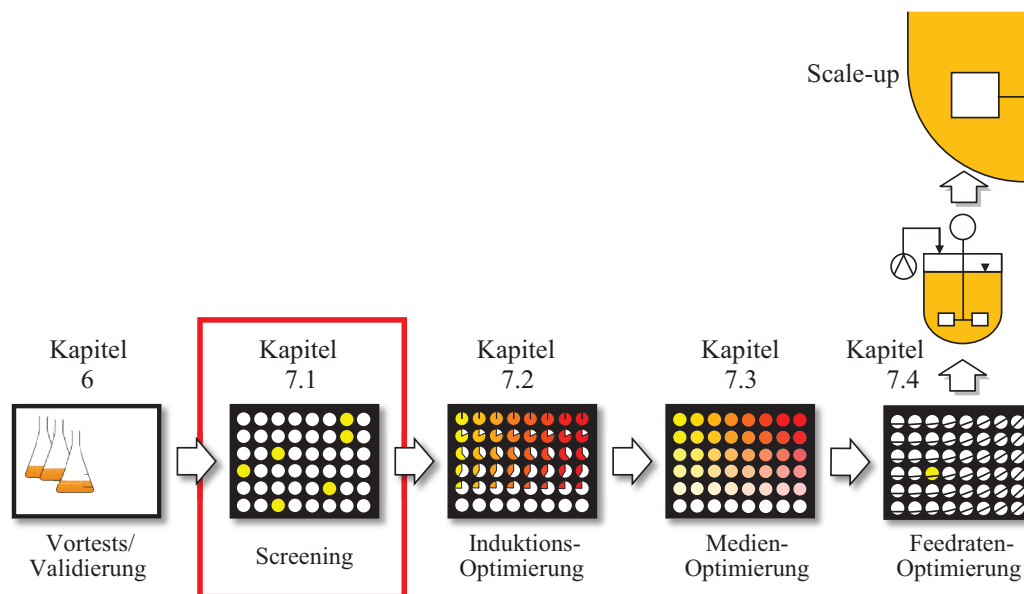


Abbildung 6.1: Abfolge der Optimierungsmodule auf dem JUELICH BIOPROCESS OPTIMIZATION SYSTEM (JuBOS).

Wie von Doig (2006) geschrieben, wird die Entwicklung von Bioprozessen zur Proteinproduktion meist in eine Stammauswahl, eine Stammverbesserung und eine Prozessoptimierung eingeteilt (vgl. Kapitel 1). In Abbildung 6.1 ist eine mögliche Anordnung von Optimierungsschritten in MBR und Modellbioreaktoren dargestellt. In dieser Anordnung steht das Stammscreening zu Beginn der Kette, am Ende die Maßstabsvergrößerung (Doig 2006). Dazwischen sind in dieser Arbeit drei Optimierungen von verfahrenstechnischen Größen aneinandergereiht, die die rekombinante Proteinproduktion beeinflussen können. Die Anwendung von diesen Schritten (Stammscreening, Induktions-, Medien- & Feedratenoptimierung) ist in den folgenden Kapiteln dargestellt.

6.1 SCREENING VON SIGNALPEPTIDEN

Für eine Bioprozessentwicklung werden in der Regel nur produktive Wirtsorganismen verwendet, die zu Beginn der Entwicklungskette in einem Stammscreening ausgewählt werden (Ahn et al. 2007; Doig 2006). In diesem Kapitel wird eine solches Stammscreening auf der automatisierten Kultivierungsplattform JuBOS entwickelt.

Bei den Scale-up Versuchen in Kapitel 5.2.2 ließen sich vier Referenz-Stämme in je 24 Kultivierungen charakterisieren. Aus den parallelen Kultivierungen werden hierbei zu unterschiedlichen Zeitpunkten ganze Wells abgeerntet. Die Enzymaktivität wird im jeweiligen Überstand gemessen, wodurch die Produktbildung im kompletten Kultivierungsverlauf dargestellt werden kann. Dieses Verfahren liefert zwar viele Informationen, jedoch können nur 2 Stämme pro Platte untersucht werden. Für Screeningverfahren sollte aber der Durchsatz pro Platte höher sein, womit die Herausforderung aufkommt, die charakteristische Kenngröße (z. B. spezifische Produktkonzentration) reproduzierbar aus nur einer Kultivierung pro Stamm zu bestimmen. Hierdurch würde der Durchsatz auf 48 Stämme pro Flowerplate erhöht. Ein entscheidender Parameter ist dabei der korrekte Erntezeitpunkt der jeweiligen Kultivierung, um repräsentative Ergebnisse zu erzielen.

In den folgenden Kapiteln wird die Entwicklung von Screeningverfahren zunächst für *B. subtilis* (Kapitel 6.1.1) und dann für *C. glutamicum* (Kapitel 6.1.2) dargestellt. Diese Methode wird anschließend in einem Screening der Signalpeptidbibliothek angewendet (Kapitel 6.1.3).

6.1.1 Screeningverfahren für *Bacillus subtilis*

In diesem Versuchsteil wird mit Hilfe des JuBOS eine automatisierte Probenahme zur Charakterisierung von *B. subtilis* Stämmen entwickelt. Hierzu werden aus 173 Signalpeptiden (SP) der Cutinase-SP-Bibliothek (Brockmeier et al. 2006a) 4 SP ausgewählt, die eine hohe Sekretion (YwmC), eine mittlere Sekretion (NprE, AmyE) und eine niedrige Sekretion (YpjP) von Cutinase bewirken.

Für die Kultivierungen von *B. subtilis* in LB Medium werden sogenannte „getriggerte“ Pipettierevents angewendet. Getriggert bedeutet hierbei, dass anhand der Onlineanalytik des BioLectors von z.B. BS oder pO_2 eine Probenahme der entsprechenden Kultivierung ausgelöst wird, während andere Kultivierungen anschließend weiter wachsen. In diesem Fall wird ein BS-basierter Trigger verwendet, der bei BS = 30 (entspricht $1.17 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ BTM) aktiv wird und 1 h später den Roboter die Kultivierung abernten lässt (Abbildung 6.2, links). Dadurch werden die Proben unabhängig von anderen, parallelen Kultivierungen in der frühen Stationärphase durch den Roboter entnommen. Die Enzymaktivitäten werden wie von Brockmeier (2006) anhand der höchsten Enzymaktivität normiert und der erhaltene Wert als Sekretionseffizienz definiert.

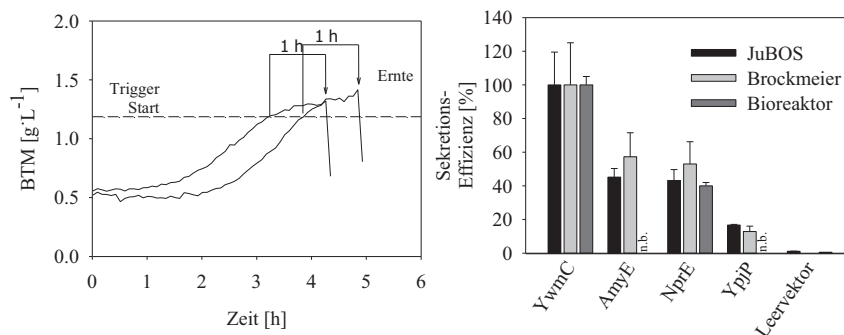


Abbildung 6.2: Getriggerte Probenahme von *B. subtilis*. Links: Schema der Trigger-Einstellungen. Rechts: Sekretionseffizienz (normiert) von vier Referenzstämmen kultiviert im BioLector und im 1 L Bioreaktor. Referenzwerte von Brockmeyer (2006a) sind mit aufgeführt. Kultivierungsbedingungen $T = 30^\circ\text{C}$. im BioLector: MVen3-Medium, $V = 1 \text{ mL}$, $n = 1200 \text{ min}^{-1}$. Bioreaktor: $V = 1000 \text{ mL}$, $\text{pH} = 7$, $pO_2 > 30\%$. Fehlerbalken der BioLector-Daten aus drei Kultivierung. Fehler von Brockmeier: 25% (Brockmeier 2006), Fehlerbalken der Bioreaktor-Daten aus Triplikaten des Lipase-Assays.

Die Sekretionseffizienz hängt stark vom gewählten Signalpeptid ab, was sich in einer Abstufung der vier Stämme, bzw. der vier Signalpeptide äußert (Abbildung 6.2, rechts). Diese Abstufung unterscheidet sich im Rahmen des statistischen Fehlers nicht von den Werten von Brockmeier et al. (2006a). Die Untersuchung von zwei der vier Signalpeptide in Bioreaktor Batchkultivierungen ergibt entsprechende Ergebnisse.

Die aus vier biologischen Replikaten ermittelte relative Standardabweichung liegt mit ca. 10% unter der statistischen Streuung der Referenz (Brockmeier et al. 2006a). Da für dieses Ergebnis 4 Kultivierungen in einer Flowerplate notwendig sind, liegt der experimentelle Durchsatz bei 12 Stämmen pro Platte. Brockmeier et al. (2006a) verwendeten 12 bis 16 DWP-Kultivierungen zur Untersuchung jedes Stammes, was pro DWP einen Durchsatz von 8 bis 6 Stämmen bedeutet. Die relative Standardabweichung wird für alle Kultivierungen mit 25% angegeben (Brockmeier et al. 2006a). Durch diesen verhältnismäßig hohen statistischen Fehler lassen sich Stämme mit ähnlichem Produktbildungsverhalten aber nicht voneinander unterscheiden.

Ob der in dieser Arbeit niedrigere statistische Fehler durch die automatisierte Probenahme in der frühen Stationärphase oder aber durch den verbesserten Sauerstoffeintrag in den verwendeten Flowerplates bedingt ist, kann hier nicht eindeutig geklärt werden. Für den Einfluss des Probenahmezeitpunktes spricht, dass *B. subtilis* dafür bekannt ist, in der Stationärphase vermehrt Proteasen zu sekretieren (Ohmuru et al. 1984). Diese Proteasen können sekretierte, rekombinante Proteine abbauen und damit inaktivieren. Befinden sich die Kultivierungen unterschiedlich lange in der Stationärphase, könnte es zu einer entsprechend hohen Streuung der Cutinaseaktivität kommen, bedingt durch den unterschiedlich fortgeschrittenen Cutinase-Abbau von Proteasen.

Für eine Sauerstofflimitation ist unter anderem eine hohe Zelldichte in einer Kultivierung verantwortlich. In der Regel ist bei niedriger Zellkonzentration die OTR weitaus kleiner als OTR_{Max} von standardmäßig verwendeten Kultivierungsgefäßen. *B. subtilis* erreicht in der Arbeit von Brockmeier et al. (2006a) im LB Medium eine nur geringe Zelldichte von $OD_{600} = 3.4$. Die in dieser Arbeit erreichte Zellkonzentration liegt mit ca. 1.5 g L^{-1} BTM bzw. $OD_{600} = 5.2$ entsprechend höher. Es ist aber möglich, dass selbst bei niedrigen Zellkonzentrationen mit $OD_{600} = 3.4$ eine Sauerstofflimitierung durch einen niedrigen OTR_{Max} bei den eingestellten Reaktionsbedingungen verursacht wird (runde DWP, 2 mL, 160 min^{-1}). Dies würde auch die niedrigere Zelldichte erklären.

Da aber die Abstufung der vier Referenzstämme der von Brockmeier et al. (2006a) ermittelten Abstufung entspricht, ist kein systematischer Fehler durch den JuBOS ersichtlich. Der geringe statistische Fehler von 10% bei einem Durchsatz von 12 Stämmen pro Platte macht die automatisierte Kultivierungsplattform zu einem geeigneten Werkzeug für eine Untersuchung der Proteinproduktion von *B. subtilis*. Für einen Beweis, wodurch der verminderte statistische Fehler zustande kommt, müsste entweder eine Probenahme der gesamten Flowerplate in der späten Stationärphase wie bei Brockmeier, Caspers et al. erfolgen, oder aber die Kultivierungen in Deepwell-Platten (DWP), anstelle von Flowerplates durchgeführt werden. In dieser Arbeit stand jedoch die Methodenentwicklung für *C. glutamicum* Screening-Experimente im Fokus. Daher werden entsprechende Versuche im folgenden Kapitel Cutinase-produzierende *C. glutamicum*-Stämme durchgeführt.

6.1.2 Screeningverfahren für *Corynebacterium glutamicum*

Aus den vorherigen Kapiteln ist bereits bekannt, dass die sekretorische Cutinaseproduktion in *C. glutamicum* während der gesamten exponentiellen Phase wachstumsgekoppelt verläuft, wenn von Beginn an induziert wird (s. Seite 69, Abbildung 5.14). Während dieser Zeit ist die biomassespezifische Cutinaseaktivität EA_{Spez} also konstant. In der späten Stationärphase (in Abbildung 5.14 ab 13 h) bleiben BS-bzw. BTM-Werte zwar stationär, die Cutinaseaktivität hingegen nimmt innerhalb von 3 h um 30 % ab. Dies bedeutet, dass die Kenngröße der biomassespezifischen Aktivität EA_{Spez} in der Stationärphase abnimmt. Am Ende der exponentiellen Phase sind Biomassekonzentration und damit die Aktivität des Zielproteins am höchsten. Eine hohe Aktivität erlaubt eine bessere Unterscheidung von unterschiedlich produktiven Stämmen im Vergleich zu Proben mit generell wenig BTM bzw. generell wenig Enzymaktivität. Um eine gute Unterscheidung zwischen verschiedenen produktiven Stämmen vornehmen zu können, sollte also am Ende der exponentiellen Phase, bzw. in der frühen Stationärphase eine Probe entnommen werden.

Um den Effekt des Probenahmezeitpunktes auf die Ergebnisse der Cutinaseaktivität zur überprüfen, werden drei *C. glutamicum* Cutinase-Produzenten untersucht. Die DNA der drei Signaleptide (epr, ywmC, amyE) liegt jeweils als Fusion mit dem Cutinase-Gen auf dem Plasmid pXMJ19 vor. Die drei Plasmidarten werden jeweils separat in einer Transformation (mittels Elektroporation³) in *C. glutamicum*-Zellen eingebracht und auf Selektiv-Agarplatten (50 mgL⁻¹ Chloramphenicol) ausplattiert. Von diesen Platten werden jeweils 12 Kolonien in BHI-

³ Durchgeführt von Britta Kleine, AG Freudl, Institut für Bio-und Geowissenschaften 1

Flüssigmedium (50 mg L^{-1} Chloramphenicol) überimpft und von hier aus nach 6 Stunden in CG XII BioLector-Kultivierungen angeimpft. Die insgesamt 36 Kultivierungen haben also alle eine andere Kolonie, sowie eine andere Vorkultur als Startmaterial und gelten damit als biologische Replikate. Anhand dieser Referenzstämme werden drei unterschiedliche Vorgehensweisen für Screeningverfahren getestet, die im Folgenden nacheinander dargestellt werden. Die einfachste Strategie ist die synchrone Ernte aller Kultivierungen zu einem Zeitpunkt.

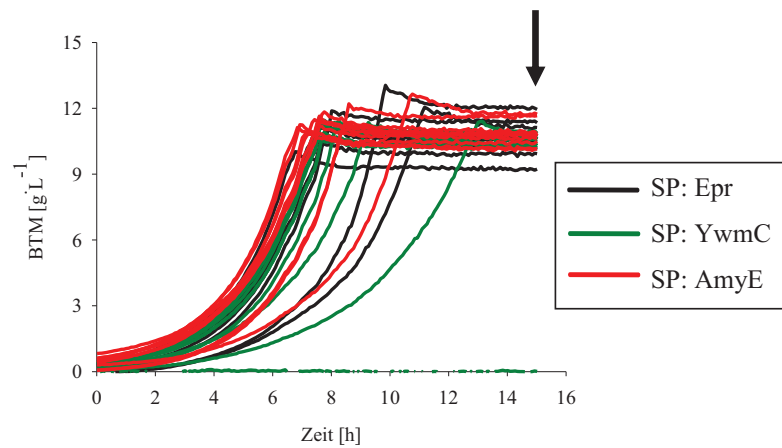


Abbildung 6.3: Synchrone Probenahme von *C. glutamicum*-Kultivierungen mit drei Signalpeptiden (schwarz: epr, grün: YwmC, rot: AmyE) mit je 12 Replikaten. Kultivierungsbedingungen: CG XII Medium mit 20 g L^{-1} Glucose, 0.5 mM IPTG, $V = 1 \text{ mL}$ in Flowerplate, $n = 1200 \text{ min}^{-1}$. Pfeil markiert den Zeitpunkt der Probenahme.

In Abbildung 6.3 ist der Biomasseverlauf der drei unterschiedlichen Cutinase-Produzenten zu sehen, die in je 12 biologischen Replikaten kultiviert werden. Die drei Produzenten lassen sich anhand eines spezifischen Wachstumsverhaltens nicht voneinander unterscheiden. Vielmehr sind die Abweichungen durch biologische Variabilität evtl. bedingt durch unterschiedliche Vorkulturführung oder die Transformation zu erklären. Eine Probenahme nach 15 h liefert nach Zentrifugation und pNPP-Assay biomassespezifische Aktivitäten, die einen verhältnismäßig hohen relativen Fehler von etwa 30% aufweisen (vgl. Werte in Tabelle 6.1).

Tabelle 6.1: **Synchrone Probenahme:** Lipolytische Aktivität der *C. glutamicum* Referenzstämme nach synchroner Probenahme aller Kultivierungen der Flowerplate.

Signalpeptid	EA _{Spez} [kU·L ⁻¹]
— Epr:	1.01 ± 0.30
— YwmC:	0.35 ± 0.12
— AmyE:	0.12 ± 0.07

Die spezifischen Aktivitäten der drei Referenzstämme, geerntet durch eine synchrone Probenahme der gesamten Platte, lassen sich zwar noch in ihrer Abstufung voneinander unterscheiden. Der statistische Fehler dieser einfachen Methode ist jedoch mit etwa 30% sehr hoch. Bei einem Stammscreening von einer größeren Anzahl an Klonen ist – anders als bei der Untersuchung von 3 Referenzstämmen – mit weniger ausgeprägten Unterschieden zu rechnen. Die hier untersuchte synchrone Probenahme wäre dabei also wegen des hohen statistischen Fehlers evtl. ungeeignet, alle Kultivierungen mit entsprechender Sicherheit zu unterscheiden.

Eine unabhängige Probenahme der verschiedenen Kultivierungen innerhalb einer Flowerplate ist durch die Anbindung des BioLectors an den Pipettierroboter möglich (s. Aufbau der Anlage, Kapitel 5.1). Um die Kultivierungen in der frühen Stationärphase zu ernten, werden wie im vorangegangenen Kapitel 6.1.1 getriggerte Pipettiererevents angewendet. Die drei Referenzstämme werden wieder mit 12 biologischen Replikaten untersucht.

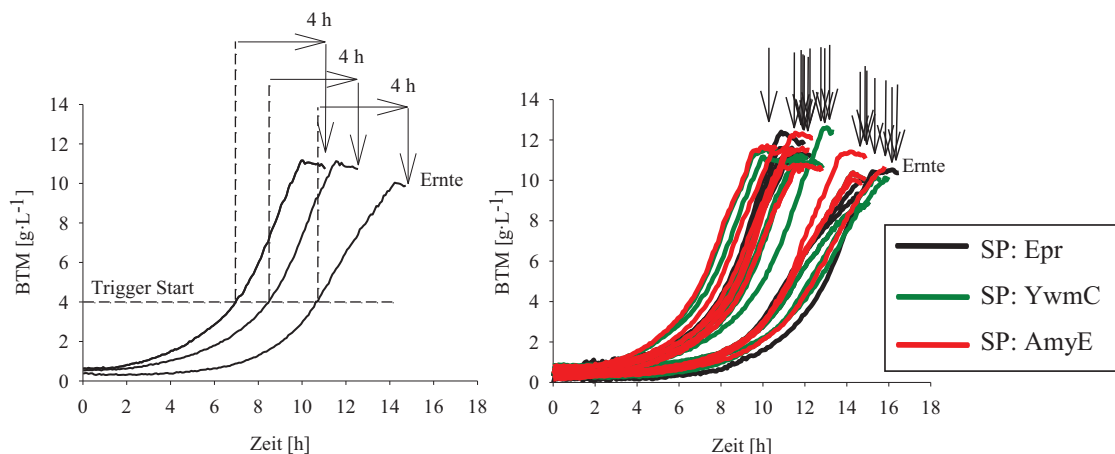





Abbildung 6.4: **Getriggerte Probenahme von *C. glutamicum*.** Links: Prinzipieller Aufbau des Triggers anhand dreier exemplarischer Kultivierungen (SP epr). Rechts: Kultivierungen von drei Produzenten (s. Legende) mit je 12 biologischen Replikaten. Kultivierungsbedingungen: CG XII Medium mit 20 gL⁻¹ Glucose, 0.5 mM IPTG, V = 1 mL in Flowerplate, n = 1200 min⁻¹.

In Abbildung 6.4 ist links der prinzipielle Aufbau des verwendeten Triggers zu sehen. Nachdem die *C. glutamicum*-Kultivierungen $\text{BTM} = 4 \text{ g L}^{-1}$ bzw. $\text{BS} = 100$ überschritten haben, wird 4 h später die Kultivierung abgeerntet. Die anderen, nicht geernteten Kultivierungen in der Flowerplate wachsen anschließend weiter. In Abbildung 6.4 rechts ist der Biomasseverlauf von drei Cutinaseproduzenten in je 12 biologischen Replikaten dargestellt. Schwarze Pfeile markieren den Zeitpunkt von Probenahmen. Die Kultivierungen werden aufgrund der unterschiedlichen Wachstumseigenschaften zu unterschiedliche Zeitpunkten zwischen 10 h und 16 h geerntet und die Zellsuspension bei 4°C gelagert. Sobald alle Kultivierungen abgeerntet wurden, wird 15 min bei 4000 g zentrifugiert, der Überstand entnommen und mit einem pNPP-Assay die lipolytische Aktivität analysiert.




Tabelle 6.2: **Getriggerte Probenahme:** Biomassespezifische lipolytische Aktivität der *C. glutamicum* Referenzstämme nach getriggelter, automatisierter Probenahme aller Kultivierungen der Flowerplate

Signalpeptid	$\text{EA}_{\text{Spez}} [\text{kU L}^{-1}]$
 Epr:	1.08 ± 0.10
 YwmC:	0.50 ± 0.07
 AmyE:	0.23 ± 0.03

Der relative Fehler der biomassespezifischen Aktivität liegt mit der hier verwendeten Strategie der getriggerten Ernte bei nur noch 10 bis 12% (Tabelle 6.2) und damit niedriger als die relativen Fehler von über 30% der synchronen Ernte (Tabelle 6.1).

Generell wird IPTG in den letzten beiden Vorgehensweisen immer von Beginn an dem Medium zugegeben. Durch die spätere Ernte bei langsamer wachsenden Stämmen sind diese damit für längere Zeit einer IPTG-haltigen Umgebung ausgesetzt als Stämme, die schnell den Pipettier-Trigger auslösen. Es wäre möglich, dass durch diese längere Induktion die schnell wachsenden Stämme bezüglich ihrer Enzymaktivität einen Nachteil gegenüber langsam wachsenden Stämmen haben. Aus dieser Überlegung heraus wird nun eine dritte Strategie vorgestellt, bei der zu Beginn kein IPTG im Medium vorliegt und dieses erst bei 4 g L^{-1} zugegeben wird, also dann wenn das Abzählen der 4 h für den Pipettierschritt startet (vgl. Abbildung 6.4). Hierdurch haben alle Stämme eine gleich lange Expressionszeit von 4 h.

Tabelle 6.3: Getriggerte Induktion und Probenahme: Biomassespezifische lipolytische Aktivität der *C. glutamicum* Referenzstämme nach getriggelter Probenahme aller Kultivierungen der Flowerplate mit einer Induktionszeit von 4 h.

Signalpeptid	EA _{Spez} [kU·L ⁻¹]
 Epr:	1.11 ± 0.11
 YwmC:	0.37 ± 0.05
 AmyE:	0.12 ± 0.02

Der relative Fehler der spezifischen Cutinaseaktivität, ermittelt mit dieser normalisierten Induktion, entspricht mit 10% bis 12% dem Fehler der Aktivitäten ermittelt durch eine Induktion von Beginn an. Auch die Mittelwerte von EA_{Spez} unterscheiden sich nur unerheblich voneinander.

Wird IPTG während des Prozesses hinzugeben, kann dies Kreuzkontaminationen zwischen den Stämmen bedingen. Ein Spülen mit Desinfektionslösung vermindert zwar das Risiko einer solchen Kontamination (s. Seite 54 ff, Kapitel 5.1.4), jedoch dauert dieser Spülschritt etwa 30 s, was zu einer verdoppelten Öffnungszeit der Klappe von insgesamt 60 s führt. In der hier dargestellten Methodenvalidierung wird auf einen Spülschritt mit Desinfektionslösung verzichtet, was in späteren Stammscreening-Experimenten zu Kontaminationen führen könnte. Eine deutliche Verbesserung des statistischen Fehlers durch die normierte Induktionszeit aller Kultivierungen wird anhand der Ergebnisse nicht deutlich.

Die biomassespezifischen lipolytischen Aktivitäten der synchronen Probenahme sowie der beiden unterschiedlichen getriggerten Probenahmen sind in Abbildung 6.5 zusammengefasst.

Die Abstufung der drei Produzenten anhand der biomassespezifischen lipolytischen Aktivität ist bei getriggelter und bei synchroner Probenahme gleich. Auch die Absolutwerte der lipolytischen Aktivität unterscheiden sich nicht deutlich voneinander. Das wesentliche Ergebnis dieser Methodenentwicklung ist der deutlich verringerte statistische Fehler durch die automatisierte Probenahme von 35% auf 10% der lipolytischen Aktivität (Abbildung 6.5 C). Ein zweiseitiger F-Test (prüft, ob Varianzen aus gleichen Grundgesamtheiten stammen) zwischen den Werten der synchronen Probenahme und den beiden getriggerten Probenahmen weist mit einer Wahrscheinlichkeit von größer 95% ($p < 0.05$) signifikante Unterschiede der Varianzen nach. Zwischen den Varianzen der beiden getriggerten Probenahmen, die sich in der Induktion unterscheiden ist kein signifikanter Unterschied feststellbar ($p > 0.5$). Durch diese nachweisliche Verbesserung in der Genauigkeit in der Produktivitätsbestimmung lassen sich mit Hilfe der automatisier-

ten, getriggerten Probenahme Unterschiede bei späteren Screeningversuchen besser feststellen. Die drei Referenzstämme sind zwar auch unter Berücksichtigung des großen statistischen Fehlers der Übernachtskultur unterscheidbar. Sind aber die Unterschiede der Stämme in späteren Screeningversuchen nicht so groß wie die der hier verwendeten Referenzstämme, so können signifikante Unterschiede evtl. nicht mehr erkannt werden. In weiteren Stammscreening-Versuchen sollten die Kultivierungen also getriggert abgeerntet werden, eine getriggerte Induktion ist hingegen nicht notwendig.

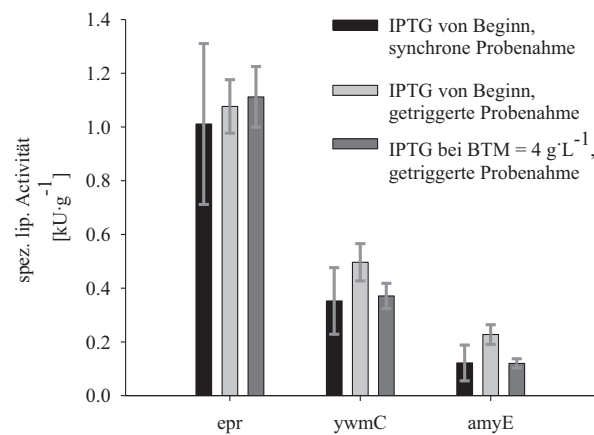


Abbildung 6.5: Vergleich der Probenahmeart. Biomassespezifische lipolytische Aktivität der Cutinase von drei *C. glutamicum* Produzenten. Zellmaterial entnommen durch roboter-gestützte, getriggerte Probenahme (schwarz) oder synchrone Probenahme (grau). Kultivierungsbedingungen: CGXII Medium mit 20 g·L⁻¹ Glucose, 0.5 mM IPTG, V = 1 mL, n = 1200 min⁻¹.

Durch die Versuche zeigt sich ebenfalls, dass die Dauer der Stationärphase die lipolytische Aktivität negativ beeinflusst: Je länger die Kultivierung bereits in der Stationärphase war, desto geringere Werte wurden im pNPP-Assay gemessen. Wahrscheinlicher Grund hierfür ist die beobachtete Inaktivierung bzw. Degradation der sekretierten Cutinase in der Stationärphase, was auch schon in Bioreaktorkultivierungen beobachtet wurde (s. Abbildung 5.14, Seite 69). Durch diese negativen Ausreißer kommt auch der jeweils leicht verringerte Mittelwert aller drei Stämme zustande.

Die Degradation bzw. Instabilität von Proteinen während der Stationärphase ist nicht auf Cutinaseproduktion mit *C. glutamicum* und *B. subtilis* beschränkt, sondern ein allgemeines Phänomen in vielen Produktionsprozessen (Manning et al. 1989; Maurizi et al. 1978). Brockmeier ermittelte bei Raumtemperatur einen Abfall der Cutinasestabilität nach sogar nur 4 h (Brockmeier 2006), wobei die untersuchten Überstände von *B. subtilis* stammten, der bekannt ist für die Sekretion von Proteasen (May and Elliott 1968). Obwohl eine Proteasesekretion bei *C. glutamicum* in dem Maße nicht beschrieben ist (Billman-Jacobe et al. 1995), kommt es dennoch zu einer Inaktivierung der Cutinase in der Stationärphase um 30% nach bereits 3 h. Auf dem JUBOS wird diese Inaktivierung durch die getriggerte Probenahme und die Probenlagerung bei 4°C minimiert. In bereits dargestellten Vorversuchen (s. Kapitel 5.2.3, Seite 73) erweist sich die Cutinaseaktivität bei 4°C als stabil über mindestens 4 Tage.

Die automatisierte Probenahme konnte in dieser Arbeit für zwei Produktionsorganismen angewendet werden. Durch die flexible Anpassung der Trigger-Einstellungen in der RoboLector-Software (m2p-labs, Aachen/D) lässt sich die Methode aber auch für jede andere Stamm-Medium-Kombination anpassen. Um informative Kenngrößen aus nur einer 1 mL Kultivierung zu erlangen, muss ein repräsentativer Ernte-Zeitpunkt in Vortests bestimmt werden und die Triggereinstellungen entsprechend angepasst werden. Eine solche automatisierte Probenahme aus MBR durch einen Pipettierroboter wurde bisher nur vereinzelt beschrieben, gewinnt aber in neuen Publikationen und kommerziellen MBR-Instrumenten zunehmend an Bedeutung (vgl. Tabelle 6.4).

Tabelle 6.4: Vergleich von bisher beschriebenen Mikrobioreaktoren (MBR) im Hinblick auf die Automatisierung der Kultivierung. Weitere Abkürzungen: Autom. = Automatisiert, DiTis = Disposable Tips, MTP = Mikrotiterplatte, DWP = Deepwellplatte, OEM = Original-Equipment-Manufacturer; k.A. = keine Angaben; n.notw. = nicht notwendig.

Referenz	MBR	Liquid Handling	Organismus	Inokulation	Induktion	Probenahme
Diese Arbeit	48er Flowerplate 1 mL	JANUS, PerkinElmer	<i>C. glutamicum</i> <i>B. subtilis</i>	Autom.	Autom. getriggert	Autom. getriggert
(Ahn 2007)	24 x 200 mL STR	OEM	<i>E. coli</i>	Autom.	Autom.	Autom.
(Zimmermann 2007)	96 MTP	Sagian, Beckmann	<i>S. cerevisiae</i>	k.A.	k.A.	Autom.

Referenz	MBR	Liquid Handling	Organismus	Inokulation	Induktion	Probenahme
Bioreactor48 (Knorr 2007)	48 STRs 9 mL	TECAN Genesis RSP 150	<i>B. subtilis</i>	Manuell	n.notw.	Autom. alle 3 h: OD, Glc, Produkt
SimCell (Amanullah 2010) (Legmann 2009)	6 Wells x 35 0.58 mL	OEM	CHO	Autom.	n.notw.	automatisiert alle 24 h
AMBR (TAP Biosystems)	24/48 MBRs 15 mL	OEM	CHO	Autom.	n.notw.	Autom.
(Isett 2007) μ 24	24er MTP 5 mL	n. notw.	<i>E. coli</i> , <i>P. pastoris</i> <i>S. cerevisiae</i>	Manuell	n.notw.	Manuell
(Huber 2009) RoboLector	96er MTP, 200 μ L	Microlab STAR, Hamilton	<i>E. coli</i>	Autom. getriggert	Autom. getriggert	Fluoreszenz online-Analytik
(Brockmeier 2006)	96er DWP, 2 mL	n. notw.	<i>B. subtilis</i>	Manuell	nicht notwendig	gesamte DWP manuell
(Hallborn 2002)	384er MTP 96er MTP	Thermo, CRS	<i>E. coli</i>	Kolonien- Picker	k.A.	Autom. gesamte MTP

Das SIMCELL-System (Amanullah et al. 2010; Legmann et al. 2009) sowie das AMBR-System (TAP Biosystems, Hertfordshire/UK) realisieren eine solche Probenahme aus Kultivierungen von suspendierten Säugetierzellen. Hier muss für die Probenahme die Inkubation gestoppt werden, was wegen des niedrigen Sauerstoffbedarfs von Säugetierzellen mit hoher Wahrscheinlichkeit keine Auswirkung auf den Kultivierungsverlauf hat. Mit beiden Systemen sind entsprechende Methoden für mikrobielle Zellen bislang nicht durchführbar.

In der HTC-Plattform von Creavis/Evonik (Zimmermann and Rieth 2007) werden Backscatter-Werte von MTP-Kultivierungen mit *S. cerevisiae* in einem MTP-Photometer bestimmt (Zimmermann and Raebiger 2006), indem die ganze MTP- aus dem Inkubator auf die Roboter-Plattform zu dem Photometer transportiert wird. Während des Transportvorganges ist der Sauerstoffeintrag stark verringert, was Auswirkungen auf die Kultivierungen in der MTP haben könnte. Auch wenn dies in der Publikation nicht beschrieben ist, wären mit der Anlage von Creavis/Evonik getriggerte Pipettiererevents prinzipiell möglich. Eine Triggerung würde hierbei jedoch anhand einer niedrigeren Anzahl an Messungen pro Zeiteinheit stattfinden, um den Einfluss des Plattentransports vom Inkubator zum Photometer so gering wie möglich zu halten. Um dennoch informative Ergebnisse zu erzielen, besteht auf der Anlage von Creavis/Evonik mit den dort verwendeten 16 Schüttelablars die Möglichkeit, 1534 Kultivierungen parallel zu inkubieren.

Durch diesen hohen Durchsatz können, wie von Zimmermann und Rieth (2007) dargestellt, ganze Kultivierungsverläufe durch wiederholte Backscatter-Messung bzw. Probenahme dargestellt werden. Ein ähnliches Vorgehen ist in Kapitel 5.2.2 für die Validierung der Cutinaseexpression im BioLector beschrieben. Der Durchsatz pro Platte würde bei Zimmermann und Rieth (2007) bei 10 Probepunkten pro Kultivierung (niedrigste Auflösung in Zimmermann and Rieth (2007)) auf 9 Stämme pro Platte, bzw. auf 138 Stämme auf der gesamten Anlage verringert werden.

Eine wiederholte Probenahme aus ein und derselben Kultivierung wird in dem STR-System bioreactor48 (2mag, München/D) durch ein erhöhtes Startvolumen von 9-12 mL realisiert (Knorr et al. 2007; Puskeiler et al. 2005a). Knorr entnahm beispielsweise in 3 h Abständen aus den 9 mL STR Kultivierungen Proben zur at-line Analyse auf dem Pipettierroboter des bioreactor48 (Knorr et al. 2007). Einen noch größeren Maßstab beschreiben Ahn et al., die eine MBR-Anlage in einer Robotikplattform mit 24 STRs zu je 200 mL Volumen etablierten (Ahn et al. 2007). Durch das erhöhte Volumen gewannen sie flexible Möglichkeiten zur automatisierten Charakterisierung von Kultivierungsverläufen mittels wiederholter Probenahme. Die Anlagenkomponenten sind jedoch nicht ohne weiteres kommerziell erhältlich, was eine breite Anwendung in der Forschung verhindern könnte.

Die Kultivierung in MTP oder DWP mit Volumina zwischen 0.1 und 2 mL hingegen wurde bisher standardmäßig durch Proben charakterisiert, die aus der gleichzeitigen Ernte der gesamten MTP stammen (Brockmeier et al. 2006a; Busso et al. 2008; Hallborn and Carlsson 2002; Hust et al. 2009; Luan et al. 2004). Für das Primärscreening, also ein Stammscreening mit z. B. 10 000 Hits pro Tag ist dieses Vorgehen entscheidend zur Durchsatzerhöhung. Eine Skalierbarkeit in Bioreaktoren bedarf aber eines Sekundärscreenings, welches unter verfahrenstechnisch kontrollierten Bedingungen mit niedrigerem statistischem Fehler stattfinden sollte.

Huber et al. und Kensy et al. verwendeten beide bei ihrer Methodenentwicklung zur beschleunigten Bioprozessentwicklung durch MTP-Kultivierungen leicht zu detektierende fluoreszierender Proteine, deren Produktion mit Hilfe der Online-Analytik des BioLectors aufgezeichnet wird (Huber et al. 2009; Kensy et al. 2009b). Da aber die Produktion von Proteinen z.B. in Sekretionssystemen wie *B. subtilis* stark vom Zielprotein selbst abhängt (Brockmeier et al. 2006a), sind Ergebnisse von z.B. GFP-Sekretionssystemen nicht zwangsläufig auf die Sekretion anderer Proteine übertragbar. Da die optimalen Kultivierungsbedingungen zur Proteinproduktion zwischen verschiedenen Proteinen nicht übertragbar sind, wird von Hust et al. (2009) anhand verschiedener Antikörperfragmente gezeigt. Es sollte nach Möglichkeit also bei der Stammauswahl, der

Stammverbesserung und der Prozessoptimierung (s. Kapitel 1) das letztliche Zielprotein untersucht werden. Für eine Veranschaulichung neuer Methoden anhand von Proof-of-Principles sind fluoreszierende Proteine sicher ein geeignetes Werkzeug. Für eine Produktionsoptimierung von nicht-fluoreszierenden Proteinen, wie es die meisten industriell relevanten Proteine sind, muss meist auf nasschemische Methoden wie Westernblot oder Aktivitätsassays zurückgegriffen werden.

An dieser Stelle knüpfen die hier entwickelten Methoden auf dem JUBOS an. Es können nun durch die Biomasse-getriggerte Probenahme Wells zu unterschiedlichen Zeitpunkten abgeerntet, z. B. am Ende der exponentiellen Phase, um so repräsentatives Probenmaterial von bis zu 1 mL für weitere Proteinanalytik zu verwenden. Dieses Vorgehen ist bisher nicht in der Literatur beschrieben und bietet eine flexible Möglichkeit relevante, skalierbare Daten von nicht fluoreszierenden Produkten auch aus MTPs zu gewinnen. Mit dieser Methode wird im Folgenden ein Stammscreening für den mittleren Durchsatz (s. Kap. 6.1.3) durchgeführt.

6.1.3 Screening von Signalpeptid/Cutinase Kombinationen

Die auf dem JUBOS entwickelte Probenahme für *C. glutamicum* (Kapitel 6.1.2) soll zur Auswahl der optimalen Signalpeptiden (SP)/Zielprotein-Kombinationen verwendet werden. Zunächst wird von Kooperationspartnern⁴ die DNA von 172 SP aus der Arbeit von Brockmeier et al. (2006a) mit dem Cutinase-Gen ligiert und in den *E. coli/C. glutamicum* Shuttle-Vektor pXMJ19 (Jakoby et al. 1999) kloniert. Durch Transformation dieses Plasmidmixes in kompetente *C. glutamicum* ATCC 13032 Zellen wachsen rekombinante Transformanten auf Agarplatten, die als Startmaterial für die Screeningprozedur genommen werden. Jede Kolonie enthält hierbei in der Regel nur eine SP/Gen-Kombination. Da es sich aber um einen Plasmidmix und damit um einen Transformationsmix handelt, kann es also sein, dass einige SP/Gen-Kombinationen doppelt untersucht werden, andere aber gar nicht. Einzelne Kolonien überimpft in BHI-Medium (+ 50 mgL⁻¹ Chloramphenicol) werden für 8 Stunden in einer 96er MTP bei T = 30°C und 900 min⁻¹ (Stufe 6) auf einem Plattformschüttler mit 1.5 mm Exzentrizität (Titramax 100, Biotest) kultiviert. Von diesen Vorkulturen dienen jeweils 50 µL als Inokulum für 950 µL Hauptkultur (Minimalmedium CG XII, 20 gL⁻¹ Glucose, 0.5 mM IPTG, 50 mgL⁻¹ Chloramphenicol). Die getriggerte Probenahme mit der Induktion von Beginn und einer Ernte 4 h nach dem Erreichen von BTM = 4 gL⁻¹ führt zu einer Ernte bei etwa 1 h nach Eintritt in die Stationärphase (Kapitel

⁴ Arbeit durchgeführt von Dr. Britta Kleine, Institut für Bio- und Geowissenschaften 1: Biotechnologie

6.1.2). Diese Methode liefert das Zellmaterial, welches bis zum Ende aller Kultivierungen auf dem Roboterdeck bei 4°C in einer Deepwellplatte gelagert wird. Die Abtrennung der Zellen erfolgt anschließend durch Zentrifugation (4000 g x 10 min), die Messung der lipolytischen Aktivität im Überstand mit dem pNPP-Assay.

Die verschiedenen Signalpeptide haben deutliche Auswirkung auf die Sekretionsleistung der aktiven Cutinase aus *C. glutamicum* (Abbildung 6.6). Zwischen dem Signalpeptid mit der höchsten Sekretionseffizienz (13.1 kU·L⁻¹) und dem mit der niedrigsten (0 kU·L⁻¹) gibt es viele Abstufungen.

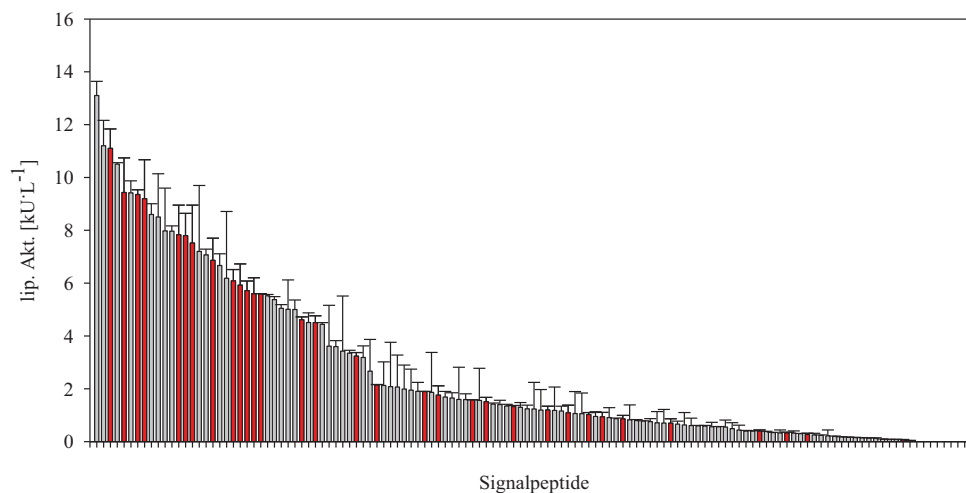


Abbildung 6.6: Ranking von Signalpeptiden der SEC-Library in *C. glutamicum*. Die den roten Balken entsprechenden Signalpeptide wurden durch Sequenzierung identifiziert. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung dreier Replikate des Enzymassays.

Aus den insgesamt 121 Klonen wird die DNA der Signalpeptide von 35 Klonen sequenziert (Abbildung 6.6, rote Balken) und den SPen von Brockmeier zugeordnet⁵. Dabei wurden 30 unterschiedliche SPe identifiziert (Tabelle 6.5), fünf Klone beinhalten also Dopplungen anderer SPe. Neben diesen 35 Klonen konnten weitere 18 Klone durch Sequenzierung nicht zugeordnet werden. Gründe hierfür sind fehlerhafte Sequenzierungsergebnisse bedingt evtl. durch Kreuzkontaminationen während Kultivierung oder der Plasmidpräparation. Bei einigen dieser 18 Plasmide liefert die Sequenzierung zwar eindeutige Ergebnisse, die identifizierten DNA-Abschnitte können

⁵ Arbeiten durchgeführt von Dr. Britta Kleine, Institut für Bio-und Geowissenschaften 1: Biotechnologie

aber keinem SP zugeordnet werden. Da aber keine einzelne SP-Art oder eine geringe Anzahl von SP-Arten den Plasmidmix dominieren, sondern aus 35 identifizierten SPen 30 als unterschiedlich identifiziert werden, eignet sich die Methode zur Auswahl der besten SP/Gen-Kombination in Screeningexperimenten.

Durch die Identifizierung der SPe ist ein Vergleich der Effizienz in *B. subtilis* (Brockmeier et al. 2006a) und *C. glutamicum* möglich. Bei diesem Vergleich (Abbildung 6.7) werden alle Kombinationen deutlich: 7 ähnlich effiziente SPe in *B. subtilis* und *C. glutamicum*, 10 ineffiziente SPe in *B. subtilis* und effiziente in *C. glutamicum* und 3 SPe genau umgekehrt. Ebenso gab es Signaleptide, die in beiden Systemen kaum Sekretion aktiver Proteine bewirkten.

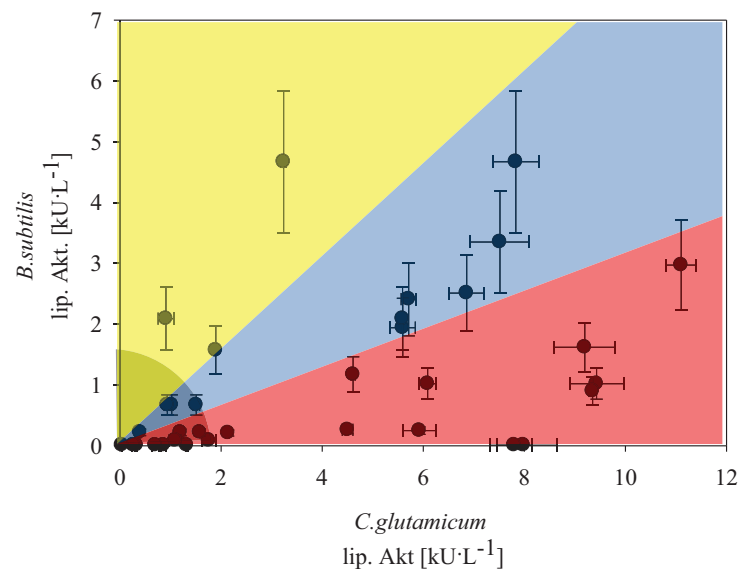


Abbildung 6.7: Stammvergleich: Aktivität der Cutinase fusioniert an verschiedene identifizierte SP in *C. glutamicum* im Vergleich mit den gleichen Konstrukten exprimiert in *B. subtilis* von Brockmeier 2006. Fehlerbalken für *B. subtilis* wurden von Brockmeier mit 25% angegeben. Fehlerbalken für *C. glutamicum* entsprechen der Standardabweichung aus dem Enzymassay.

Tabelle 6.5: Signalpeptide und die lipolytische Aktivität der daran fusionierten Cutinase, produziert mit *C. glutamicum* (diese Arbeit) und in *B. subtilis* (aus Brockmeier 2006). Blau: In *B. subtilis* und *C. glutamicum* ähnlich aktive SPe; Rot: in *B. subtilis* ineffiziente, in *C. glutamicum* effiziente SPe; Gelb: in *B. subtilis* effiziente, in *C. glutamicum* ineffiziente SPe.

Nr.	Signalpeptid	Lip. Aktivität <i>C. glutamicum</i> [kU·L ⁻¹]	Δ	Lip. Aktivität <i>B. subtilis</i> [kU·L ⁻¹]	Δ	Ladung N- region ^a	Hydro- phobizität ^b [%]	D-Score ^c
1	Bpr	11.1	± 0.30	2.97	± 0.74	5	56.67	0.936
2	YkvV	9.43	± 0.53	1.02	± 0.26	2	76.92	0.808
3	yxiT	9.35	± 0.08	0.9	± 0.23	2	71.88	0.707
4	LipB	9.2	± 0.60	1.62	± 0.41	2	75	0.914
5	yxaK	7.98	± 0.66	0.01	± 0.00	3	73.17	0.679
6	Epr	7.83	± 0.46	4.67	± 1.17	2	62.96	0.919
7	yXaK	7.8	± 0.34	0.01	± 0.00	3	73.17	0.679
8	Csn	7.52	± 0.59	3.35	± 0.84	3	62.86	0.689
9	ybdN	6.86	± 0.34	2.51	± 0.63	2	60	0.853
10	YkvV	6.09	± 0.17	1.02	± 0.26	2	76.92	0.808
11	ywtD	5.92	± 0.33	0.25	± 0.06	2	68.75	0.763
12	yddT	5.71	± 0.15	2.41	± 0.60	4	60.71	0.901
13	yurI	5.6	± 0.25	1.94	± 0.49	2	75	0.871
14	ybbE	5.59	± 0.00	2.09	± 0.52	2	60	0.825
15	ywmC	4.61	± 0.05	1.17	± 0.29	3	69.57	0.912
16	xwmD	4.5	± 0.11	0.26	± 0.07	2	73.91	0.789
17	Epr	3.24	± 0.05	4.67	± 1.17	2	62.96	0.919
18	yfkN	2.14	± 0.01	0.21	± 0.05	3	62.86	0.654
19	dacB	1.9	± 0.00	1.57	± 0.39	3	66.67	0.876
20	yHjA	1.76	± 0.15	0.09	± 0.02	2	74.07	0.577
21	YdbK	1.58	± 0.00	0.22	± 0.06	3	69.7	0.699
22	amyE	1.51	± 0.07	0.67	± 0.17	3	78.79	0.904
23	yoqH	1.32	± 0.02	0.01	± 0.00	2	65.22	0.744
24	YdbK	1.19	± 0.06	0.22	± 0.06	3	69.7	0.699
25	YHjA	1.09	± 0.12	0.09	± 0.02	2	74.07	0.577
26	amyE	1.02	± 0.03	0.67	± 0.17	3	78.79	0.904
27	amyE	0.94	± 0.07	0.67	± 0.17	3	78.79	0.904
28	ybbE	0.91	± 0.15	2.09	± 0.52	2	60	0.825
29	yoqH	0.86	± 0.05	0.01	± 0.00	3	62.86	0.654
30	ywgB	0.7	± 0.07	0.01	± 0.00	2	62.5	0.656
31	YdbK	0.4	± 0.02	0.22	± 0.06	3	69.7	0.699
32	ywtF	0.33	± 0.01	0.01	± 0.00	9	56.41	0.675
33	yqzC	0.27	± 0.02	0.01	± 0.00	2	67.65	0.518
34	yvpB	0.04	± 0.00	0.01	± 0.00	2	68	0.775
35	yycP	0	± 0.00	0.01	± 0.00	2	77.78	0.725

a: Die Netto Ladung wurde berechnet mit Asp, Glu definiert als -1, Arg, Lys als +1, alle übrigen als 0. b: Anteil [%] hydrophiler Aminosäuren wurde berechnet mit Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Met, Phe, Trp, Pro als hydrophobe AS. Alle übrigen AS wurden als hydrophil definiert. c: D-Score berechnet mit Signal-P anhand der AS-Sequenz

Eine modellgestützte Bewertung vorhandener SPe bzw. ein Design artifizierlicher SPe anhand der Aminosäuresequenz wurde vorgeschlagen (Dyrlov Bendtsen et al. 2004). Eine Kenngröße, der D-score soll darüber Auskunft geben, inwieweit die Sequenz sich als Signalpeptid eignet. Bereits Brockmeier konnte durch die systematische Untersuchung aller Signalpeptide von *B. subtilis* beweisen, dass diese Kenngröße keine Aussagekraft bezüglich der Effizienz eines Signalpeptids in *B. subtilis* hat. Die Berechnung des D-scores hängt nur davon ab, ob der Wirtsorganismus Gram-

positiv oder Gram-negativ ist. Da beide hier betrachteten Organismen Gram-positiv sind, entsprechen die D-score-Werte des SP in *C. glutamicum* den D-Score-Werten der SP in *B. subtilis*. In dieser Arbeit wird mittels Korrelationsanalyse diese fehlende Übereinstimmung von hohem D-Score und guter Sekretionseffizienz für *C. glutamicum* bestätigt (Tabelle 6.6).

Weitere häufig verwendete SP Kenngrößen wie die Hydrophobizität des SP und die Ladung der N-Region (Borchert and Nagarajan 1991; Li et al. 1988) werden ebenfalls auf die Korrelation zur Cutinasesekretion untersucht. Bei keiner der Kenngrößen ergibt sich ein Korrelationskoeffizient > 0.75 . Auch diese Größen eignen sich also nicht zur Vorhersage der SP-Effizienz in *C. glutamicum*.

Tabelle 6.6: Korrelation verschiedener Kenngrößen zur Proteinsekretion: Fokus auf lipolytischer Aktivität der 30 identifizierten Signalpeptide in *C. glutamicum* (C.g.). $\rho = 1$ bedeutet vollständige Korrelation, $\rho = 0$ keine Korrelation, $\rho = -1$ ist eine vollständig gegenläufige Korrelation. Abkürzungen: B.s.: *B. subtilis*; B.l.: *B. licheniformis*.

Korrelationspartner	Korrelationskoeffizient $\rho(X,Y)$
C.g. vs. C.g.	1.00
B.s. vs. B.l.	0.77 ^a
B.s. vs. C.g.	0.48 ^b
D-Score vs. C.g.	0.36
D-Score vs. B.s.	0.34 ^b
N-Region vs. C.g.	-0.07
Hydrophobizität vs. C.g.	-0.04

a: B.s. und B.l. Daten entnommen aus FIG.5, A von Degering et al. (2010)

b: B.s. Daten entnommen aus „Supplemental Data“ von Brockmeier et al. (2006a)

Tabelle 6.7: Genomvergleich: Vergleich der Genome von *B. subtilis* 168 und *C. glutamicum* ATCC 13032 und *B. licheniformis* ATCC 14580. Abk.: e.z.: extrazellulär.

	<i>B. subtilis</i> 168	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	<i>B. licheniformis</i> ATCC 14580
Genomgröße	4.214.810 BP ^a	3 282 708 BP ^b	4 222 336 ^f
kodierender Anteil	87.0 % ^a	87.0 % ^b	87.9 % ^f
ORF	4100 ^a	3002 ^b	4208 ^f
GC-Gehalt	43,5 % ^a	53.8 ^b	46.2 ^f
rRNA-Operon	10 ^a	6 ^b	7 ^f
tRNA	86 ^a	42 ^b	72 ^f
Potentielle SP	297 ^a	405 ^c	296 ^f
e.z. Proteasen	27 ^d	3 ^e	22 ^f

a: (Kunst et al. 1997) b: (Kalinowski et al. 2003) c: (Watanabe et al. 2009) d: (Tjalsma et al. 2004) e: (Yukawa et al. 2007) f: (Rey et al. 2004; Veith et al. 2004).

Degering et al. (2010) hingegen erkannten eine verhältnismäßig gute Korrelation der SP-Effizienz bei einem Transfer von *B. subtilis* zu zwei *B. licheniformis*-Stämmen (Degering et al. 2010). Bei der Korrelation der Sekretionseffizienz der von Degering untersuchten SP in beiden Organismen äußert sich dies in einem hohen Korrelationskoeffizienten von 0.77 (s. Tabelle 6.6). Die von ihm untersuchten Stämme sind jedoch enger miteinander verwandt, was anhand der Ähnlichkeit von Genomgröße, ORF-Anzahl und potentieller Signalpeptide deutlich wird (Tabelle 6.7). *B. subtilis* und *C. glutamicum* unterscheiden sich hingegen stark voneinander, was vor allem bei der Anzahl der Open Reading Frames (ORFs), beim GC-Gehalt und der Anzahl extracytosolischer Proteasen deutlich wird (Tabelle 6.7).

Weiterhin unklar ist auch der Einfluss der Kultivierungsbedingungen wie Medium, Plasmid, Induktion oder Codon-Usage auf die Abstufung der SPe. Es ist möglich, dass diese Faktoren die Abstufung ebenso verändern wie ein Stammwechsel. Degering verwendete in jedem Stamm die gleichen Shuttlevektoren, die kompatibel mit allen *Bacillus*-Arten waren. Für einen Transfer von *B. subtilis* zu *C. glutamicum* sind bisher keine Shuttlevektoren verfügbar, weswegen unterschiedliche Plasmide verwendet werden müssen. Durch einen solchen Wechsel des Plasmids kann sich z.B. die Expressionsrate des neuen Promotors von der Expressionsrate des ursprünglichen Plasmids unterscheiden. Wenn aber bei einer schlechten SP/Gen-Kombination die Sekretion der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist, bei einer guten aber die Expressionsrate, so können ehemals gute SP/Gen-Kombinationen durch einen schwächeren Promotor auf die Produktivität der schlechten SP/Gen-Kombination herabgesetzt werden. Neben diesem Phänomen, dass ehemals produktive Klone durch eine verminderte Expressionsrate schlechter werden, sind Produktivitätseinbußen auch durch eine zu starke Überexpression möglich. So kann es bei einer zu hohen Expressionsrate von Genen mit starken Signalpeptiden möglicherweise zu einer „Verstopfung“ der Zellwand kommen (Caspers et al. 2010). Würde also die Expressionsrate durch z.B. einen starken Promotor oder starke Induktion heraufgesetzt, so kann es auch hier zu Produktivitätseinbußen kommen. Ob die veränderte Abstufung nun auf einen Expressions-, einen Sekretions- oder einen Prozessierungseffekt (z.B. Abtrennen des Zielproteins von der Zellwand) zurückzuführen ist, kann also nicht geklärt werden. Die Veränderung zeigt aber auch die Relevanz von experimentellem *Trial-and Error*-Verfahren, bzw. Screeningverfahren für die zukünftige Produktionsentwicklung sekretorischer Proteine. Hierfür steht nun ein adäquates Mittel auf dem JUBOS zur Verfügung.

Die Anzahl möglicher SPe beträgt in dieser Arbeit 172, wohingegen kommerzielle SP-Bibliotheken inzwischen mehr als 800 SPe haben (Leggewie et al. 2010). Möchte man bei entsprechenden Screening-Experimenten mit statistischer Sicherheit jedes SP mindestens einmal untersuchen, sollte die Anzahl der Kultivierungsansätze dreimal so hoch liegen (Busso et al. 2008). Für die in dieser Arbeit untersuchten 172 SP müssten also 11 Flowerplates kultiviert werden, für die kommerzielle SP-Bibliothek 50 Flowerplates, bzw. 25 DWP. Ein hoher Durchsatz ist bei einem SP-Auswahlverfahren also unerlässlich. Würden jede einzelne SP-DNA einzeln mit dem entsprechenden Zielgen ligiert, kloniert und transformiert, wäre zwar die Anzahl notwendiger Kultivierungsexperimente um den Faktor 3 niedriger, der Arbeitsaufwand der molekularbiologischen Arbeiten aber wesentlich größer. Da jedoch bei Screening-Experimenten der Arbeitsaufwand pro Klon niedrig gehalten werden sollte, wird der höhere Durchsatz normalerweise in Kauf genommen.

Wie erwähnt werden entsprechende Leistungen zum Screening von Signalpeptiden seit 2010 bereits von der Firma Evocatal angeboten. Sie gibt für die Auswahl der besten aus 800 Signalpeptiden eine Zeit von sechs Wochen an (Leggewie et al. 2010). Auch bei diesem Service wird diese kurze Entwicklungszeit durch einen erhöhten Durchsatz mittels DWP-Kultivierungen in einem Vertiga DWP Inkubator mit 96 bis 768 Kultivierungsansätzen erreicht. Da der Probenahmezeitpunkt bei DWP-Kultivierungen für die gesamte DWP synchron in der Stationärphase erfolgt, muss mit hohen statistischen Schwankungen gerechnet werden. Durch eine unzureichende Sauerstoffversorgung und die Inaktivierung der sekretierten Proteine in der Stationärphase können Fehlinformationen bei dieser Stammauswahl für die Bioprozessentwicklung entstehen. Es kann damit gerechnet werden, dass unter diesen Bedingungen produktive Klone als falsch-negativ gewertet werden. Im schlimmsten Fall jedoch führen die verfahrenstechnisch wenig charakterisierten Bedingungen in DWP zu einem als positiv bewerteten Klon, der sich in Bioreaktorkultivierungen als wenig produktiv erweist. Um solche falsch-positiven Klone zu vermeiden, erfolgt häufig nach der Stammauswahl im hohen Durchsatz eine Verifikation der produktiven Eigenschaften im mittleren Durchsatz (Ahn et al. 2007; Hallborn and Carlsson 2002).

Zusammengefasst ist die Hauptaussage dieses Kapitels, dass bei der Wahl des optimalen Signalpeptids für *C. glutamicum* das *Trial-and-Error* Verfahren in Form eines experimentellen Screenings nach wie vor für jedes neu zu produzierende Protein durchgeführt werden muss. Weder der D-score, noch andere Kenngrößen oder vorherige Ergebnisse aus *B. subtilis* können das

Verhalten der Signalpeptide vorhersagen. Möchte man nun *C. glutamicum* erneut als Produktions-Organismus für ein anderes Protein verwenden, so ist das entwickelte Screeningverfahren nach wie vor notwendig, da die Wahl eines effizienten SP von dem jeweiligen Gen abhängt. Dies konnte bereits anhand einer sekretierten Esterase im Vergleich zur Cutinase gezeigt werden (Brockmeier et al. 2006a). Die notwendige experimentelle Auswahl der korrekten SP/Zielprotein-Kombination unterstreicht die Relevanz der hier entwickelten Screeningmethode für zukünftige Proteinproduktionen. Das entwickelte Screeningverfahren lässt sich darüber hinaus flexibel für andere Fragestellungen wie ein Promotorscreening oder eine Medienoptimierung abwandeln. Diese Allgemeingültigkeit macht die Methode zu einem wichtigen Werkzeug der automatisierten Kultivierungsplattform.

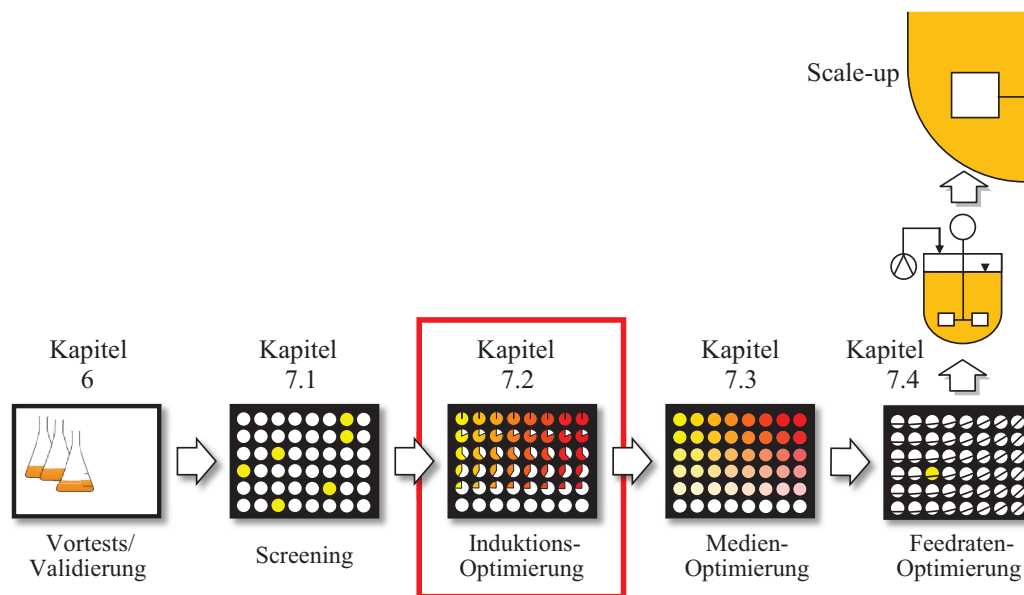


Abbildung 6.8: Abfolge der Optimierungsmodule auf dem JUELICH BIOPROCESS OPTIMIZATION SYSTEM (JuBOS).

6.2 INDUKTIONSOPTIMIERUNG VERSCHIEDENER ZIELPROTEINE

Die heterologe Proteinexpression steht in der Regel unter der Kontrolle von Promotern, die sich durch äußere Reize, die sogenannte Induktion, aktivieren lassen. Je nach Promotorart kann die Zugabe einer chemischen Substanz, eine Erhöhung der Temperatur, das Einsetzen einer Limitation u.ä. als Induktion wirken. Bei Produktionsprozessen kommt es dabei unter anderem auf die Induktionsstärke und den Zeitpunkt der Induktion an. Im Folgenden werden diese beiden Parameter mit dem von Huber 2009 entwickelten *Induction Profiling* (Huber et al. 2009) für fünf verschiedene Zielproteine auf der JuBOS-Plattform durchgeführt.

6.2.1 Induction Profiling: Sekretorische Proteine

In der Arbeit von Huber et al. (2009) wird vorgeschlagen, das dort entwickelte *Induction Profiling* als Methode zu benutzen, um die optimale Induktionsstärke und den optimalen Induktionszeitpunkt einer Stamm-Vektor-Kombination zu ermitteln. Anknüpfend hieran soll im folgenden Ergebnisteil geprüft werden, ob sich die optimalen Induktionsbedingungen von einem Protein auf ein anderes Protein mit der gleichen Stamm/Vektor-Kombination übertragen lassen.

Hierzu wird ein *Induction Profiling* mit zwei verschiedenen Proteinen in dem Stamm-Vektor System pEKEX2/*C. glutamicum* durchgeführt. Die Expression des Zielgens wird durch einen mit IPTG induzierbaren tac-Promotor gesteuert. Auf dem untersuchten Plasmid ist das Gen eines sekretorischen GFP kodiert. Dieses leicht detektierbare Modellprotein liegt als Fusion mit dem Signalpeptid der Phosphodiesterase (phoD) aus *C. glutamicum* vor, um es über den Twin Arginin Translocation (TAT) Pathway in aktiver Proteinstruktur zu sekretieren (Meissner et al. 2007). Dieser zu dem SEC-Weg alternative Sekretionsmechanismus transportiert in der Regel korrekt gefaltete Proteine, was für die Ausbildung des Chromophors des GFP und damit für dessen Fluoreszenz-Aktivität von Bedeutung ist. Als zweites sekretorisches, aber nicht-fluoreszierendes Protein wird dieselbe Stamm-Vektor-Kombination mit der Cutinase verwendet, welche fusioniert an das Signalpeptid der Protease NprE aus *B. subtilis* gebildet wird. Dieses Signalpeptid NprE ist ein Substrat für den SEC-Pathway, bei dem Proteine meist in ungefalteter Form sekretiert werden.

Da die Analyse der Cutinaseproduktion nicht online im BioLector erfolgen kann, werden die Kultivierungen durch den Pipettierroboter in der frühen Stationärphase geerntet und die Cutinaseaktivität im Überstand mit dem pNPP-Assay (s. Kapitel 4.4) analysiert. Für einen repräsentativen Vergleich zwischen beiden Proteinen wird die GFP Fluoreszenz zu dem Zeitpunkt aus den Onlinedaten entnommen, bei dem auch die Kultivierungen der Cutinaseproduktion durch den Pipettierroboter abgeerntet werden (vgl. Abbildung 6.9).

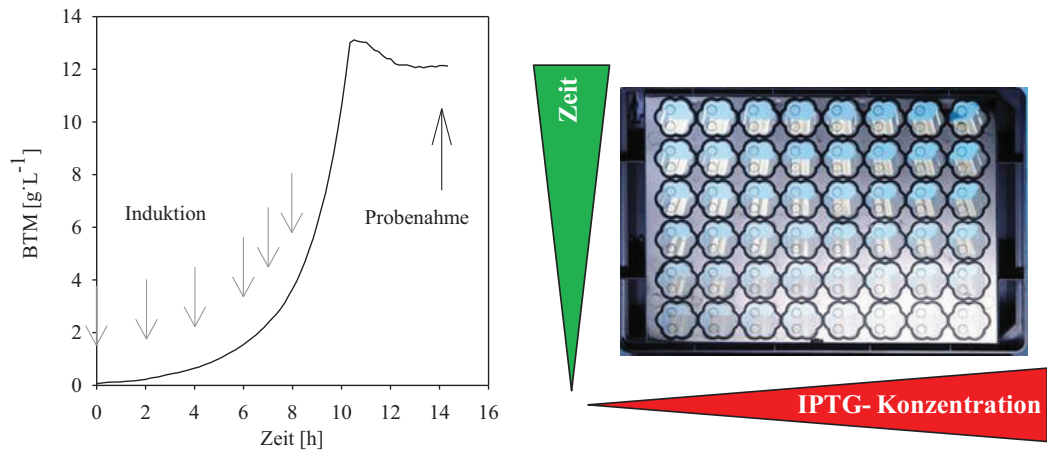


Abbildung 6.9: Schema des Induction Profilings von phoD-GFP und der NprE-Cutinase in *C. glutamicum*.

In vielen Publikationen wird ein IPTG-Anteil von $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ für lac-basierte Promotoren verwendet (Berrow et al. 2006; Donovan et al. 1996) wobei die Spanne verwendeter Konzentrationen zwischen $0.005 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ und $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ liegt. Zur Produktion sekretorischer Proteine wird hingegen eine niedrige IPTG-Konzentration angegeben (Donovan et al. 1996), um die Sekretionsmechanismen durch zu hohe Expressionsraten nicht zu blockieren und eine korrekte Prozessierung des Proteins während der Transportmechanismen (Ablösen von der Zellwand, Faltung) zu gewährleisten. Daher werden in diesem Versuchsteil zur Untersuchung sekretorischer Proteine IPTG Konzentrationen zwischen 0 und $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ eingestellt.

Für jedes Induction Profiling wird eine Flowerplate, also 48 parallele Kultivierungsansätze verwendet (Abbildung 6.9, rechts). Dabei werden 7 IPTG Konzentrationen ($0; 0.05; 0.1; 0.2; 0.3; 0.5; 1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) zu 6 unterschiedlichen Kultivierungszeitpunkten ($0; 2; 4; 6; 7; 8 \text{ h}$) zugegeben, wodurch sich ein voll-faktorieller Versuchsplan ergibt. Die Länge der exponentiellen Phase entspricht ohne Induktion und unter den in diesem Versuch vorliegenden Bedingungen ($\text{Glc} = 20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\mu = 0.41 \text{ h}^{-1}$, $\text{OD}_{\text{Start}} = 1$) zwischen 9 h und 10 h (Abbildung 6.9, links). Die letzte Induktion erfolgt anhand des Zeittriggers also kurz vor Ende der exponentiellen Phase. Die 6 Ansätze mit $0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ IPTG wurden doppelt bestimmt, alle anderen erfolgen in Einfachbestimmung. Die

lipolytische Aktivität im Überstand, bzw. die Fluoreszenzintensität werden in der Stationärphase nach 14 h Kultivierungszeit bestimmt (vgl. Abbildung 6.9, links).

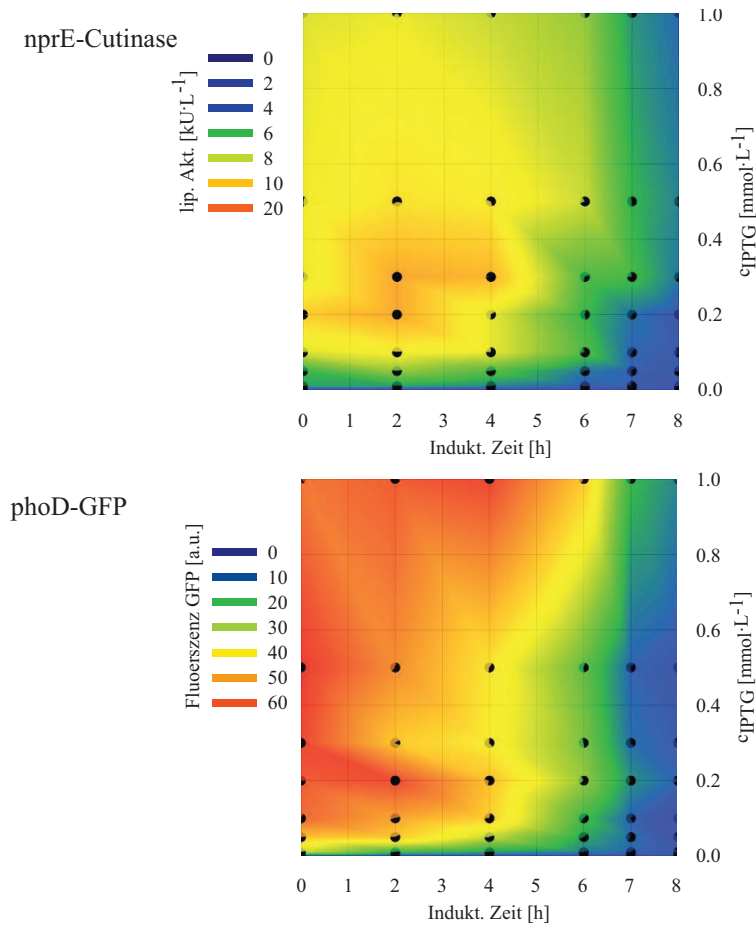


Abbildung 6.10: Sekretorische Proteine: Induction Profiling von NprE-Cutinase (oben), phoD-GFP (unten).

In Abbildung 6.10 sind die Ergebnisse der Produktbildung beider Proteine beim Induction Profiling dargestellt, welche sich in ihrer Form deutlich voneinander unterscheiden. Würde die für phoD-GFP optimale Bedingung (frühe und starke Induktion, FL ≈ 60 a.u.) auf die NprE-Cutinase übertragen (niedrige Induktion in mittlerer exponentieller Phase), wäre mit einer Enzymaktivität von EA ≈ 9 kU·L⁻¹ die hier beobachtete maximale Ausbeute von EA ≈ 14 kU·L⁻¹ bei

den Bedingungen $0.3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ IPTG und einem Induktionszeitpunkt nach 2 h bis 4 h nicht erreicht, sondern um sogar 35% reduziert.

Bei beiden Proteinen erkennt man ohne Zugabe von IPTG eine nur geringfügige Produktbildung, die leicht über den Werten eines Leervektors liegt (Daten hier nicht gezeigt). Der Promotor hat also eine leichte Basalaktivität. Eine Zugabe von IPTG in der späten exponentiellen Phase ergibt ebenfalls keine deutlich gesteigerte Produktbildung beider Proteine, wohingegen sich zwischen 0.1 und $0.3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ IPTG ein lokales Optimum bei Zugabe in der frühen bis mittleren exponentiellen Phase ausbildet. Ein deutlicher Unterschied ergibt sich bei Konzentrationen über $0.4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. Während durch eine Zugabe von hohen IPTG-Konzentrationen ($> 0.3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) die Cutinaseproduktion um bis zu 40% einbricht, bildet die GFP-Produktion ein Plateau bei hohen IPTG-Konzentrationen aus. Es bildet sich eine leicht diagonale Grenze zwischen Plateau und dem Gebiet mit reduzierter Aktivität, was bedeutet, dass man bei weit fortgeschrittenen Kultivierungen durch eine starke Induktion eine Produktivität im Bereich des Optimums erreichen kann. Ist also viel Biomasse vorhanden, muss auch mit hoher IPTG-Konzentration induziert werden.

Huber schlägt wie eingangs erwähnt für die Anwendung des Induction Profilings vor (Huber et al. 2009), zunächst das Verhalten eines Stamm-Vektor-Systems anhand eines Modellproteins zu untersuchen und anhand dieser Versuche ein generelles Vorgehen für Screeningversuche von Proteinbibliotheken mit diesem Produktionsorganismus zu erstellen. Aus diesen Versuchen wird nun aber deutlich, dass das Verhalten beim Induktionsprofiling auch vom Zielprotein an sich abhängt.

Der Einfluss von Induktionsstärke und Induktionszeitpunkt bei lac-basierten Promotoren wird von Donovan zusammengefasst (Donovan et al. 1996). Wie auch bei Dübel (Dübel et al. 1992) werden hier für sekretorische Proteinproduktion generell niedrige IPTG-Konzentration empfohlen. Donovan beobachtet bei starker Induktion, also bei hoher Transkription, zwar eine erhöhte Proteinbiosynthese und Sekretion, aber demgegenüber eine stärkere Fehlfaltung der sekretierten Proteine einhergehend mit Aktivitätsverlust. Gleiche Phänomene während Sekretionsvorgängen beschreiben Harwood und Cranenburgh in ihrem Review (Harwood and Cranenburgh 2008). Dieser Anteil an inaktivem Protein könnte auch für den Einbruch der Cutinase-Produktivität bei hohen IPTG-Konzentrationen verantwortlich sein. Die Menge an gebildetem Protein wurde anhand der Enzymaktivität, bzw. der GFP-Fluoreszenz quantifiziert und nicht mit SDS/Westernblot verifiziert. Eine Bestimmung der inaktiven Proteinmenge ist hier nicht möglich, könnte aber mit-

unter den Unterschied zwischen den unterschiedlichen Proteinen erklären, da Proteinaktivität und -Stabilität in hohem Maße von der Tertiärstruktur abhängen (Baneyx and Mujacic 2004).

Eine weitere Erklärung ist im Unterschied der jeweiligen Sekretionsmechanismen zu suchen. Das *phoD*-Signalpeptid (fusioniert mit GFP) ist ein TAT-Substrat (Meissner et al. 2007), das *NprE*-Signalpeptid (fusioniert mit Cutinase) hingegen ein SEC-Substrat (Brockmeier et al. 2006a). Der Unterschied zwischen den beiden Proteinen während des Induction Profilings kann also auch von den sich voneinander unterscheidenden Sekretionsmaschinerien stammen (Weiner et al. 1998). Über den TAT-Weg werden korrekt gefaltete, Cofaktor enthaltende Proteine sekretiert. Da aber mit dem SEC-Mechanismus ungefaltete Proteine sekretiert werden, könnte sich bei der extrazellulären Reifung, also dem Abschneiden des in der Zellwand verankerten Signalpeptids bzw. der Faltung zu aktivem Enzym, ein Engpass der Proteinproduktion bei hohen Expressionsraten bilden. Bei zu hoher Sekretion kann, wie von Caspers beschrieben die Gram-positive Zellwand blockiert werden, wodurch dort verankerte Enzyme degradiert werden (Caspers et al. 2010). Da Caspers ebenfalls Signalpeptide des SEC-Mechanismus untersuchte, ist die Blockierung ein möglicher Grund für das Einbrechen der Cutinaseproduktion bei starker Induktion.

Da GFP im extrazellulären Raum nicht korrekt faltet, muss es über den TAT-Weg sekretiert werden (Meissner et al. 2007). Zur Zeit der Experimente lag die Cutinase jedoch nicht mit einem TAT-Substrat wie dem Signalpeptid *phoD* vor. Dadurch kann der Einfluss des Sekretionsweges auf die unterschiedlichen Ergebnisse des Induction Profilings nicht von dem Einfluss der Proteinstruktur unterschieden werden. Für diesen Zweck werden im folgenden Kapitel Induktionsprofile von nicht sekretierten, intrazellulär akkumulierenden heterologen Proteinen dargestellt.

6.2.2 Induction Profiling: intrazelluläre Proteine

Im Folgenden ist die Untersuchung von drei heterologen Proteinen dargestellt, die ohne ein Signalpeptid intrazellulär in *E. coli* exprimiert werden. Eines der Proteine ist die Lipase A aus *Bacillus subtilis* (BSLA, s. Funke et al., 2003), deren Aktivität mit dem pNPP-Assay analysiert wird. Das zweite Protein ist das blau fluoreszierende *Flavin based fluorescent protein* (FbFP), welches im BioLector online detektierbar ist (Drepper et al. 2007). Als drittes Protein wird ein transkriptionales Fusionskonstrukt beider Proteine untersucht (Krauss et al. 2009), dessen Aktivität sowohl anhand der Fluoreszenz, als auch anhand dessen lipolytischer Aktivität bestimmt werden kann⁶. Da das Fusionsprotein FbFP-BSLA sowohl fluoreszierende als auch enzymatische Eigenschaften besitzt, korreliert das Signal der Fluoreszenz mit der lipolytischen Aktivität (vgl. Abbildung 5.13, Seite 67). Daher lässt sich die Online-Analytik des BioLectors für eine Detektion aktiver Proteine verwenden.

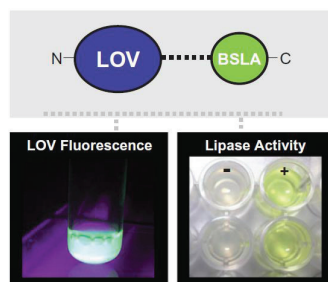


Abbildung 6.11: Schema des untersuchten Fusionsproteins aus Krauss et al. (2009). In-vivo Korrelation zwischen Enzymaktivität und Fluoreszenz vgl. Abbildung 5.13, Seite 67.

Die Produktion aller drei Proteine erfolgt mit dem pet28a-Vektor in *E. coli* BL21 (DE). In diesem Stamm wird nach IPTG-Zugabe die auf dem Genom codierte T7 Polymerase gebildet, welche dann an den Plasmidpromotor bindet und das eigentliche Gen des Zielproteins exprimiert. Auch bei diesen Versuchen wird zu gleichen Zeitpunkten die FbFP Fluoreszenz mit dem BioLector, bzw. die lipolytische Aktivität ermittelt. Um die Lipaseaktivität der intrazellulär vorliegenden Lipase A zu untersuchen werden die Zellen mit Hilfe von 0.2 mgL^{-1} Lysozym unter Zusatz von Tween20 (Kapitel 4.4) aufgeschlossen. In Abbildung 6.12 sind exemplarisch drei Punkte des Induktionsprofils für die Produktionsstämme fluoreszierender Proteine sowie einem pet28a Leervektorstamm dargestellt.

⁶ Plasmidkonstrukte erhalten von Kathrin Scholz (nee Klein), Ulrich Krauss und Thomas Drepper, Institut für molekulare Enzymtechnologie, HHU Düsseldorf

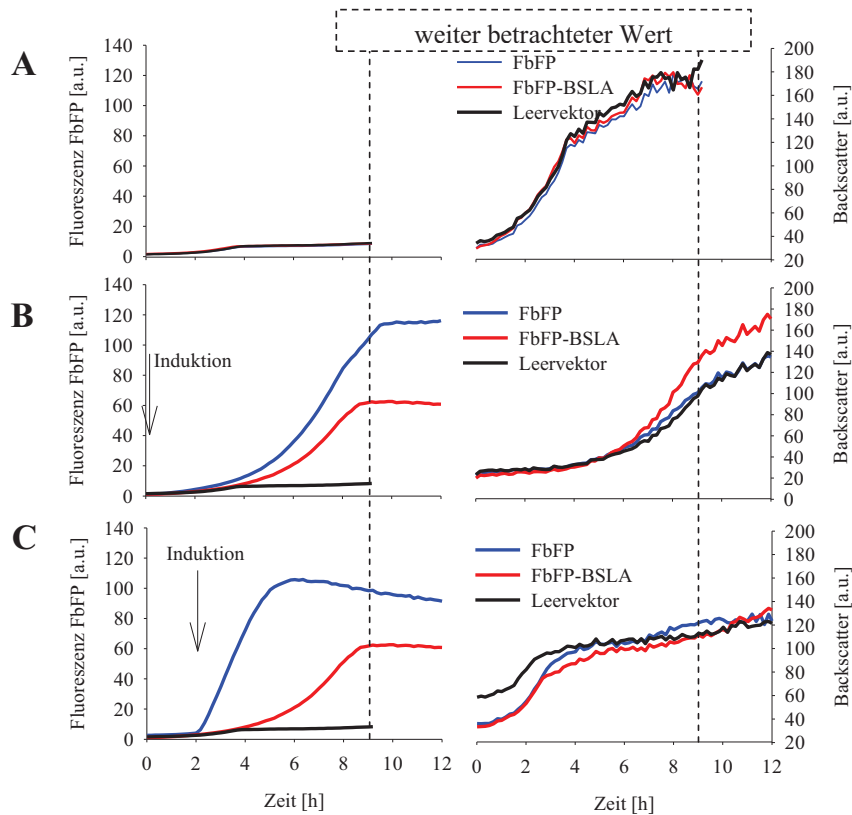


Abbildung 6.12: Expression intrazellulärer, fluoreszierender Proteine in *E. coli* mit unterschiedlichen Induktionsbedingungen. Links: Produktbildung anhand des Fluoreszenzsignals im BioLector (FbFP, Em: 458 Ex: 505). Rechts: Biomasseverlauf anhand des Backscatter im BioLector. A: Keine Induktion; B: Induktion zu Beginn mit 0.5 mmol L^{-1} ; C: Induktion nach 2 h mit 1 mmol L^{-1} . Werte bei $t = 9 \text{ h}$ werden für das Induction Profiling verwendet.

Ist die Expression nicht induziert, erkennt man bei den Produktionsstämmen keinen Unterschied zu den Fluoreszenzsignalen eines Leervektorstammes (Abbildung 6.12 A). Der lac-Promotor vor der im Genom integrierten T7-RNA Polymerase ist also ohne Induktion bei den betrachteten Bedingungen (Batchkultur, Wilms-Reuss-Medium) nicht messbar aktiv, was diese Stamm-Vektor-Kombination für ein Induction Profiling attraktiv macht. In den folgenden Induktionsprofilen wird pro Kultivierungsansatz die Aktivität zum Zeitpunkt $t = 9 \text{ h}$ als Kenngröße angegeben. Mit Hilfe des JuBOS hätten auch getriggerte Probenahme-Events durchgeführt werden können. Da in keine Inaktivierung der fluoreszierenden Proteine beobachtbar ist (s. Abbildung 6.5), wird in diesem Versuchsteil der Wert in der Stationärphase entnommen. Diese Phase ist bei $t = 9 \text{ h}$ in allen Kultivierungen erreicht. Die Daten werden zur besseren grafischen Vergleichbarkeit anhand des jeweils höchsten Wertes normiert.

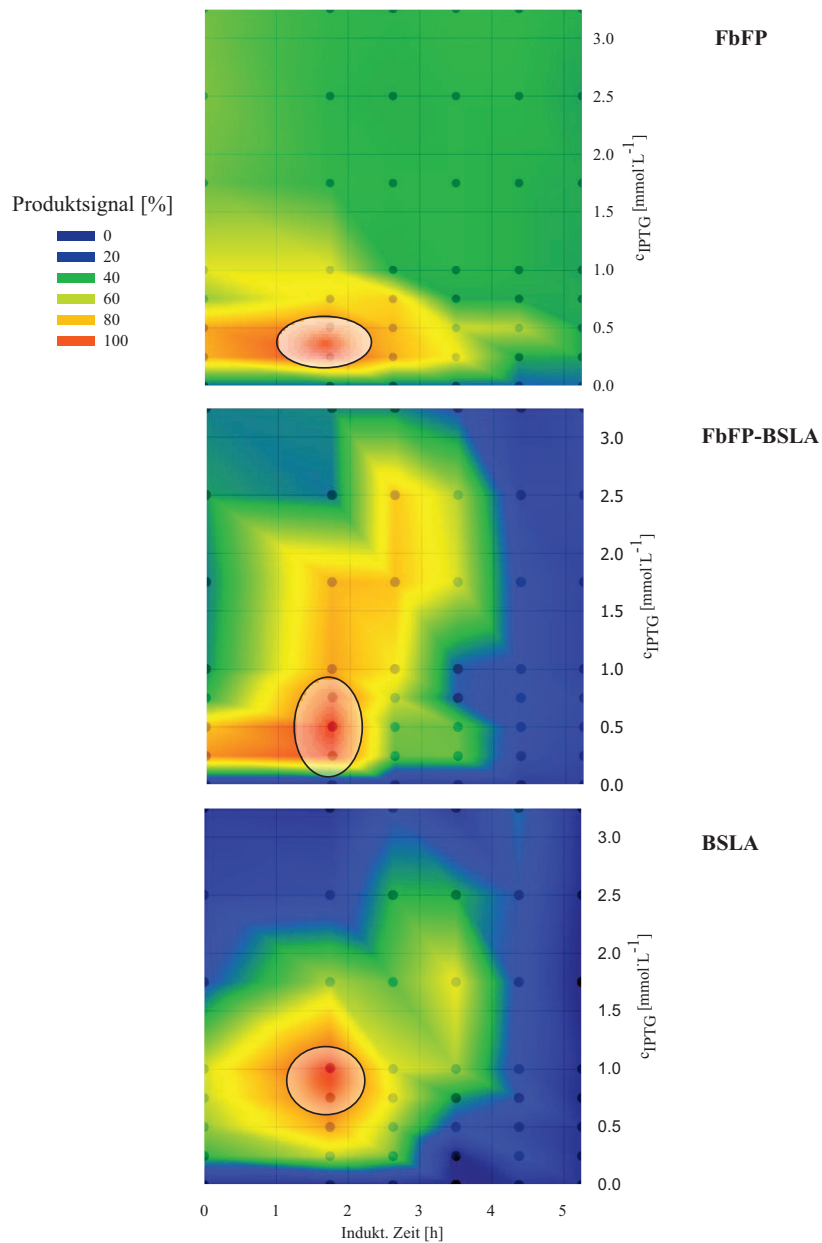


Abbildung 6.13: Intrazelluläre Proteine: Induction Profiling von FbFP-BSLA, FbFP, BSLA in *E. coli*. Dargestellt sind Werte (lipolytische Aktivität bzw. Fluoreszenz) entnommen bei 9 h Kultivierungszeit. Weiße Ellipsen markieren die optimalen Induktionsbedingungen.

Alle drei Proteine bei unterschiedlichen IPTG-Konzentrationen optimal in aktiver Form exprimiert (Ellipsen in Abbildung 6.13). Ein deutlicher Unterschied des optimalen Zeitpunktes der Induktion ($t = 2 \text{ h}$), also der optimalen Biomassekonzentration ist dabei nicht erkennbar. Eine feinere Rasterung in den ersten drei Stunden der Kultivierung könnte hier aber genauere Ergebnisse und damit mögliche Unterschiede der optimalen Induktionszeit liefern.

Die eingesetzte IPTG-Konzentration hat hingegen einen direkten Einfluss auf die Bildung aktiver Proteine. Das Protein FbFP wird optimal bei niedriger IPTG-Konzentration gebildet. Dies deckt sich mit Aussagen von Huber (Huber et al. 2009), der ebenfalls ein Induktionsprofil des Proteins im gleichen *E. coli*-Stamm mit einem anderen Plasmid (pRhotHi) aufgenommen hat. Das Optimum für die Expression des Fusionsproteins FbFP-BSLA liegt im ähnlichen Bereich wie FbFP, bildet aber im Gegensatz zum diesem ein diagonales Profil aus. Es muss also mit fortschreitender Wachstumsphase mehr IPTG zugegeben werden. Diese vermehrte Zugabe würde bei der Expression von FbFP, was nicht als Fusionskonstrukt vorliegt, nicht mehr Aktivität bewirken.

Die Expression der BSLA (Abbildung 6.13 unten) wird optimal mit $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ IPTG induziert, besitzt also eine höhere optimale Konzentration als beide anderen Proteine. Ein diagonales Profil, also ein optimales Verhältnis zwischen Biomasse und IPTG-Konzentration, ist bei diesem Protein nicht derart ausgeprägt wie bei dem Fusionskonstrukt. Für eine spätere Bioprozessführung im Fed-Batch wäre dieses Verhältnis zwischen Biomasse und IPTG eventuell hilfreich, um der Feedlösung eine optimale Menge an IPTG zuzusetzen (Bayer et al. 2002).

Während fluoreszierendes FbFP zu etwa 50% auch bei hohen IPTG-Konzentrationen gebildet wird, lässt sich BSLA nur bei einem prägnanten Optimum von $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ IPTG effektiv produzieren. Wird jedoch eine hohe IPTG Konzentrationen eingestellt ($2.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ bzw. $3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) lässt sich das Produktsignal von nur noch 30% kaum von den Produktsignalen der Kultivierungen ohne Induktion (7 %) unterscheiden.

Würde man die optimalen Bedingungen von FbFP ($0.25 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) auf BSLA übertragen, so erreichte man nur 75% der maximalen Aktivität, die mit $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ erreicht wird. Überträgt man die optimale IPTG-Konzentration des Fusionskonstrukts ($0.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) auf BSLA, wird immerhin 90% des Maximalwerts der BSLA erreicht. Das Fusionskonstrukt FbFP-BSLA erweist sich somit als geeigneter im Gegensatz zu FbFP, um die Bildung von BSLA in einem Induktionsprofil darzustellen. Das tatsächliche Optimum wird aber auch mit dem Fusionskonstrukt nicht erreicht.

Fluoreszierende Proteine werden in vielen Veröffentlichungen als Modellproteine zur Bioprozessoptimierung verwendet (Albano et al. 1998; Chae et al. 2000a; Chae et al. 2000b; Kensy et

al. 2009a; Rucker et al. 2001). Die Optimierung der Kultivierungsbedingungen wird dabei nur anhand der fluoreszierenden Proteine durchgeführt und ggf. der optimale Punkt mit einem nicht-fluoreszierenden Protein validiert. Der gesamte Parameterraum wird dabei aufgrund des hohen Arbeitsaufwands der nasschemischen Proteinanalytik in den wenigsten Fällen mit dem industriell relevanten, nicht fluoreszierenden Protein untersucht. Eine dieser Lücken wurde in dieser Arbeit am Beispiel des Induction Profilings geschlossen, welches zeigt, dass die unterschiedlichen Proteine ein untereinander abweichendes Verhalten in dem betrachteten Parameterraum aufweisen. Das Problem, dass unterschiedliche Proteine auch unterschiedliche optimale Produktionsbedingungen haben ist hingegen bekannt (Braun and LaBaer 2003; Hust et al. 2009).

Induktionszeit und Induktionsstärke hat bisher aber nur Huber weitreichend systematisch untersucht (Huber et al. 2009). In seiner Publikation wird die Methode des Induction Profilings vorgestellt. Als Anwendung wird vorgeschlagen, die Vektor-Stamm-Kombination für ein Design des anschließenden Screenings mit einem Induktionsprofil zu charakterisieren. Anhand dieser Ergebnisse soll die Induktionsstrategie für das Stammscreening erstellt werden. Aufgrund der nun vorliegenden Ergebnisse wird jedoch deutlich, dass unterschiedliche Proteine auf der gleichen Stamm-Vektor-Kombination unterschiedlich Induktionsprofile besitzen.

Mögliche Gründe für diese Unterschiede werden aus den Ergebnissen nicht deutlich, da hier die Fluoreszenz (FbFP, FbFP-BSLA) bzw. die Enzymaktivität (BSLA) gemessen wurde. Z. B. wurde für FbFP eine Bildung von Inclusion Bodies nicht beschrieben (Drepper et al. 2007), für das Fusionsprotein hingegen schon (Drepper, persönliche Mitteilung). Eine detailliertere Analyse des Zellmaterials, z. B. durch Trennung von löslicher und unlöslicher Fraktion könnte hier genauere Hinweise liefern. Weiterhin würde eine Unterscheidung zwischen der hier gemessenen Enzymaktivität und der rekombinant gebildeten Enzymmenge z.B. mit SDS-Page oder „Targeted Proteomics“ weitere Hinweise auf die Gründe der beobachteten Unterschiede liefern.

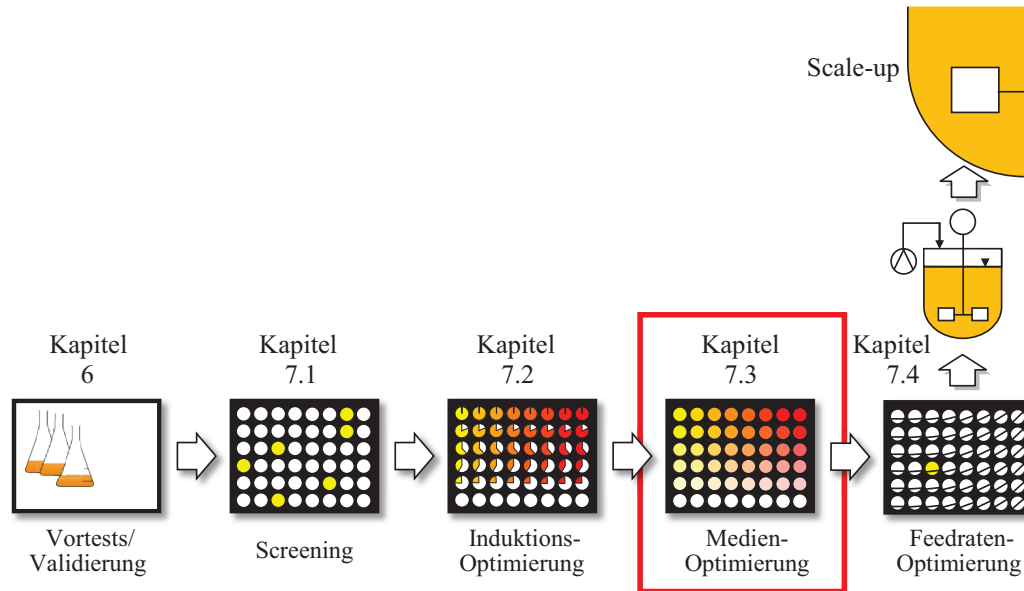


Abbildung 6.14: Abfolge der Optimierungsmodule auf dem JUELICH BIOPROCESS OPTIMIZATION SYSTEM (JUBOS).

6.3 MEDIENOPTIMIERUNG FÜR DIE PROTEINSEKRETION VON *CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM*

Nährmedien und vor allem Minimalmedien enthalten eine Vielzahl von definierten Komponenten, deren Konzentrationen einen Einfluss auf Wachstum und Produktbildung haben können. Bei der Optimierung dieser Konzentrationen sollten, aufgrund möglicher gegenseitiger Wechselwirkungen, die kombinatorischen Effekte der Komponenten untersucht werden. Aufgrund der daraus resultierenden hohen Anzahl von Kultivierungsexperimenten werden hierbei häufig Methoden der statistischen Versuchsplanung eingesetzt. Bei einer entsprechend hohen Anzahl von Parametern ist der Kultivierungsaufwand dennoch hoch, weswegen der experimentelle Durchsatz erhöht werden sollte. Robotikplattformen ermöglichen es dabei, das arbeitsintensive Pipettieren bei der Medienerstellung zu beschleunigen, sowie die Fehleranfälligkeit herabzusetzen. Im folgenden Kapitel wird die automatisierte Kultivierungsplattform JUBOS für eine solche Medienoptimierung angewendet.

Für *C. glutamicum* sind mehr als 15 Minimalmedien mit unterschiedlichen Zusammensetzungen beschrieben (Schrumpf 1991; Vallino and Stephanopoulos 1993; von der Osten et al. 1989; Weuster-Botz et al. 1997). Bei der Entwicklung dieser Medien lag das Hauptaugenmerk vornehmlich auf der optimierten Bildung niedermolekularer Produkte wie z.B. Lysin. Eine Produktion heterologer Proteine mit diesem Stamm steht erst seit kurzer Zeit im Fokus von Forschung und Entwicklung – unter anderem von der Firma Ajinomoto (Tokyo/Japan), die unter dem Handelsnamen CorynexTM verschiedene Plasmid-Stamm-Systeme zur Proteinsekretion mit *C. glutamicum* anbietet (Date et al. 2006; Kikuchi et al. 2008b). Bei diesen Proteinproduktionen wird ein auf CG XII basierendes, bisher nicht beschriebenes Minimalmedium aufgeführt. Eine Entwicklung dieses Mediums ist jedoch nicht publiziert, weswegen davon auszugehen ist, dass bisher keine systematische Medienoptimierung zur optimalen Proteinsekretion erfolgte.

Ziel der folgend dargestellten Versuche ist es, diese Wissenslücke zu schließen und zu prüfen, ob eine Medienoptimierung für *C. glutamicum* einen Einfluss auf dessen Proteinproduktion hat. Das Zielprotein ist in diesem Versuch GFP, welches über den TAT-Weg mit dem phoD-Signalpeptid sekretiert wird. Es werden zunächst Voruntersuchungen durchgeführt, in denen 19 Bestandteile ohne Kombinationen untereinander variiert werden (OFAT-Analyse, vgl. Kapitel 3.5). Anschließend werden diejenigen Bestandteile ausgewählt, die den größten Einfluss auf die spezifische Proteinproduktion hatten. Eine Untersuchung von allen 19 Bestandteilen und deren Kombinationen würde auch mit statistischer Versuchsplanung zu einer zu hohen Versuchsanzahl von über 10^6 führen. Die Auswirkungen dieser ausgewählten Komponenten-Kombinationen werden daher mittels evolutionärer Algorithmen erst nach der Vorauswahl systematisch untersucht.

6.3.1 Voruntersuchungen zur Medienoptimierung

In dieser Voruntersuchung wird der Einfluss von 19 Medienbestandteilen auf Wachstum und Proteinproduktion untersucht. Von diesen 19 Komponenten entsprechen 11 den Standardkomponenten des Minimalmediums CG XII. Sechs weitere Komponenten erwiesen sich bei der Lysinproduktion in Fed-Batch Medien als einflussreich (Weuster-Botz et al. 1997). Zusätzlich wird der Einfluss des kompatiblen Soluts Betain als eine auf Proteine stabilisierend wirkende Komponente untersucht. Dabei werden alle Startkonzentrationen bis auf die zu untersuchende Substanz konstant gehalten. Alle Substanzen sind in der später folgenden Tabelle 6.8 (S. 122) aufgelistet.

Der BioLector hat die Möglichkeit, Biomasse und GFP-Fluoreszenz über den gesamten Kultivierungszeitraum aufzuzeichnen (Abbildung 6.15). Von allen Ansätzen werden aus diesen Daten verschiedene Kennzahlen ermittelt. Einfach zu ermittelnde Größen sind Maximalwerte von Backscatter und Fluoreszenz. Wie in Abbildung 6.15 zu erkennen, steigt die Fluoreszenz aber in der Stationärphase weiter an. Um einen Einfluss der Länge der Stationärphase auf die Zielgröße Fluoreszenz zu unterbinden, wird die biomassespezifische Fluoreszenz FL_{Spez} bei Einbruch des Biomassesignals, also bei Substratlimitation aus den Daten entnommen. Durch diese Maßnahme haben die Länge der Stationärphase und damit eine in dieser Phase stattfindende dynamische Signalveränderung auf die ermittelte biomassespezifische Kenngröße keinen Einfluss.

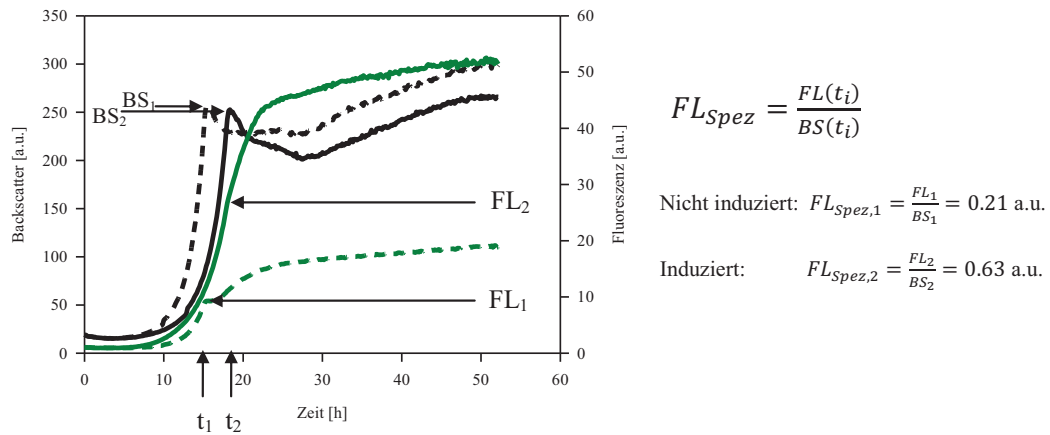


Abbildung 6.15: Biomasse und GFP-Fluoreszenz zweier Kultivierungen: Backscatter (schwarz) und Fluoreszenzwerte (grün) der nicht induzierten (1, gepunktete Linie) und der induzierten (2, durchgezogene Linie) Referenzkultivierung von *C. glutamicum* mit dem Plasmid pEKEX::phoD-gfp. Für die Medienoptimierung wird die biomassespezifische Fluoreszenz FL_{Spez} am Ende der exponentiellen Phase ermittelt (s. rechts).

Alle Kenngrößen werden mit Werten einer in jeder Flowerplate angesetzten Referenzkultivierung in CG XII Medium (0.5 mM IPTG, 25 mgL⁻¹ Kanamycin) normiert. Werte über 100% zeigen also eine positive Wirkung der Komponente an, unter 100% eine negative Auswirkung. Hierdurch werden die Ergebnisse weniger sensitiv gegenüber dem schlechter zu kontrollierenden Einfluss biologischen Ursprungs, wie der biologischen Variabilität der Vorkulturen von verschiedenen Tagen. In der folgenden Abbildung 6.16 ist der Einfluss aller 19 Komponenten auf die drei Kenngrößen „maximaler Backscatter“, „maximale GFP-Fluoreszenz“ FL_{Max} und „spezifische Fluoreszenz“ FL_{Spez} dargestellt.

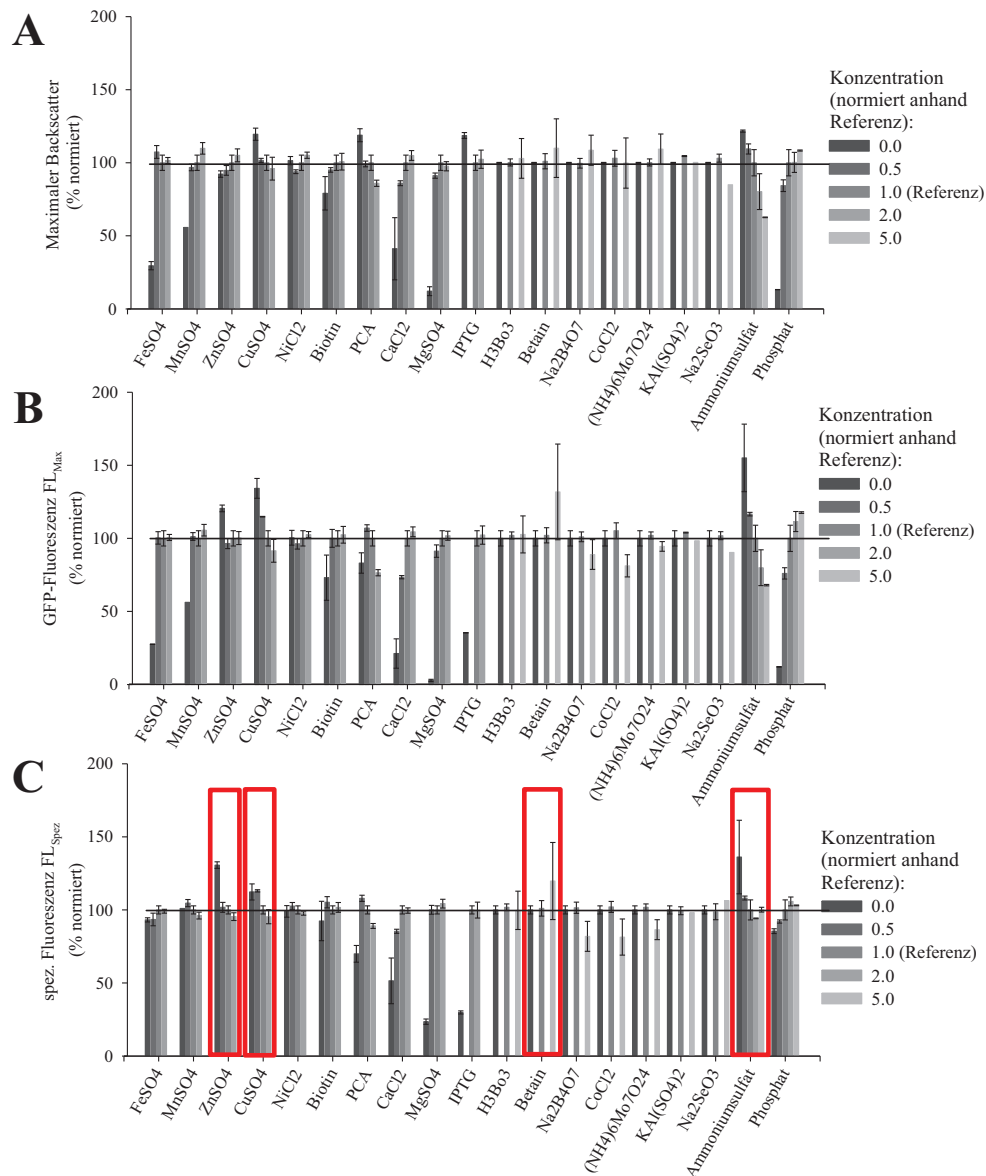


Abbildung 6.16: Screening von 19 Komponenten mit den Referenzkonzentrationen nach Keilhauer et al. (1993) und Weuster-Botz et al. (1997). Auswirkung auf den maximalen Backscatterwert (A), die maximale GFP-Fluoreszenz (B), und die biomassespezifische Fluoreszenz FL_{Spez} (C) von *C. glutamicum* mit dem Plasmid pEKEX::phoD-gfp. Alle drei Parameter werden anhand der Referenzkultivierung (CG XII + 0.5 mM IPTG = 100 %) normiert. Fehlerbalken stammen aus einer Doppelbestimmung biologischer Replikate.

In Abbildung 6.16 sind die drei Kenngrößen des Backscatter, der Fluoreszenz, sowie der biomassespezifischen Fluoreszenz FL_{Spez} aus 140 Kultivierungsansätzen dargestellt. Es gibt hierbei sowohl Komponenten, die einen positiven Einfluss, als auch Komponenten, die einen negativen Einfluss auf die jeweiligen Kenngrößen haben. Die Biomasseausbeute (Abbildung 6.16, A) wird vor allem durch die Variation der Ammoniumsulfat- und K_2HPO_4/KH_2PO_4 -Konzentration beeinflusst. Die Fluoreszenz (Abbildung 6.16, B) wird neben diesen beiden Komponenten ebenfalls durch die Kupfersulfat-, Zinksulfat-, und Betain-Konzentration beeinflusst.

Interessanterweise bewirkt eine Veränderung der Phosphat- oder Ammoniumkonzentration eine Fluoreszenz von über 100 %, die spezifische Fluoreszenz FL_{Spez} hingegen (Abbildung 6.16 C) wird nur durch eine veränderte Ammoniumkonzentration auf über 100% erhöht. Phosphat hat also auf die Fluoreszenz nur einen positiven Einfluss, weil es zu einer gesteigerten Biomassebildung kommt. Bei diesen Voruntersuchungen wird dadurch deutlich, dass die Wahl der Zielgröße bei der Medienoptimierung einen entscheidenden Einfluss auf die Ergebnisse haben kann.

Zwei der drei eben betrachteten Kenngrößen sind Ausbeute-Kenngrößen, die Auskunft darüber geben wie viel maximale Biomasse, bzw. wie viel maximale Fluoreszenz in einem Kultivierungsverlauf erreicht wird. In der Charakterisierung von Kultivierungen werden darüber hinaus häufig Bildungsraten von Biomasse oder Produkt angegeben. Anhand der Daten der Online-Analytik des BioLectors ist es möglich, solche Bildungsraten zu berechnen. Eine häufig verwendete Rate zur Charakterisierung des Biomassewachstums ist die maximale, spezifische Wachstumsrate μ_{Max} (s. auch Formel 1, Seite 15). Wichtige Kenngrößen zur Beschreibung der Produktbildung ist die Produktbildungsrate r_p bzw. die biomassespezifische Produktbildungsrate q_p (s. auch Formel 16, S. 20). Die Maximalwerte beider Parameter werden anhand des GFP-Fluoreszenz-Signals bestimmt.

Der Einfluss der 19 Medienkomponenten auf diese drei Raten ist in der folgenden Abbildung 6.17 dargestellt. Wie auch in Abbildung 6.16, werden die Werte, sowie die Konzentrationen, normiert dargestellt. Liegen die Werte über 100% haben sie also einen positiven Effekt auf die Kenngrößen.

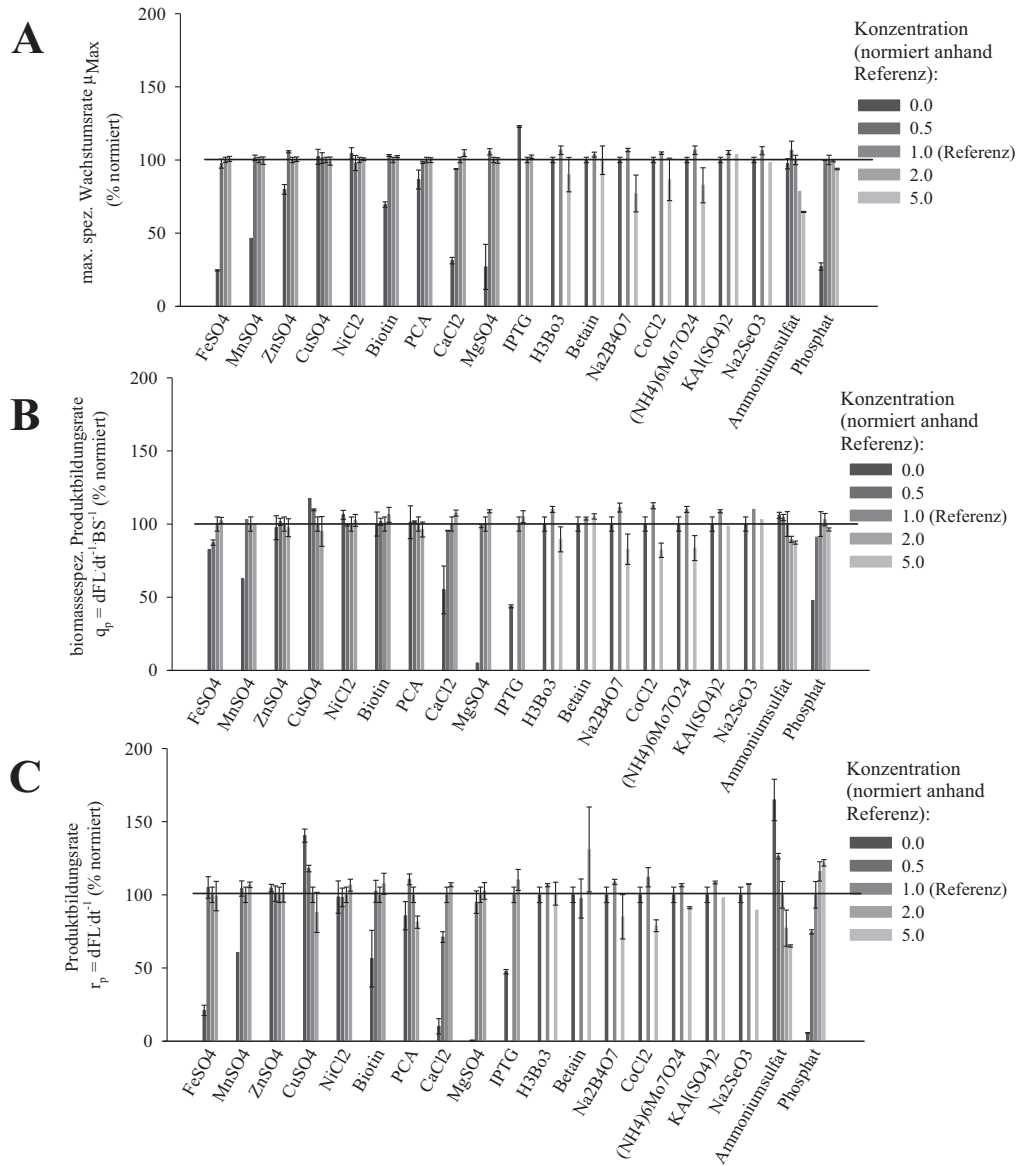


Abbildung 6.17: Screening von 19 Komponenten mit den Referenzkonzentrationen nach Keilhauer et al. (1993) und Weuster-Botz et al. (1997). Auswirkung auf die maximale spezifische Wachstumsrate μ_{Max} mit $\mu = \text{dBS dt}^{-1} \text{BS}^{-1}$ (A), die maximale biomassespezifische Produktbildungsrate $q_{p, \text{Max}}$ mit $q_p = \text{dFL dt}^{-1} \text{BS}^{-1}$ (B), die maximale Produktbildungsrate $r_{p, \text{Max}}$ mit $r_p = \text{dFL dt}^{-1}$ (C) von *C. glutamicum* mit dem Plasmid pEKEX::phoD-gfp. Alle drei Parameter werden anhand der Referenzkultivierung (CG XII + 0.5 mM IPTG = 100 %) normiert. Fehlerbalken stammen aus einer Doppelbestimmung biologischer Replikate.

Auch die Bildungsraten werden durch die unterschiedlichen Medienkomponenten beeinflusst. Auffallend ist hierbei aber, dass die maximale spezifische Wachstumsrate (Abbildung 6.17, A) in keinem Kultivierungsexperiment außer durch $c_{\text{IPTG}} = 0$ höher als 100% liegt, also höher als die Referenzkultivierung, in der ja $0.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ IPTG enthalten sind. Das Medium CG XII, auf dem diese Ergebnisse basieren, scheint also in Hinblick auf ein maximales Biomassewachstum optimiert zu sein. In publizierten Arbeiten wird keine Angabe über die Zielgröße während der Entwicklung des Minimalmediums CG XII gemacht (Keilhauer et al. 1993; Schrumpf 1991).

Wie auch bei der maximalen Fluoreszenz, führt ein Biomassebezug der Produktbildung zu anderen Werten als die Betrachtung der Produktbildung ohne diese Normierung. So wird die Produktbildungsrate (Abbildung 6.17, C) stark positiv durch eine Variation der Phosphatsalz-Konzentration beeinflusst, die biomassespezifische Produktbildungsrate jedoch nicht. Auffallend ist, dass die Fluoreszenz und die biomassespezifische Fluoreszenz von Zinksulfat beeinflusst werden, die beiden Produktbildungsraten hingegen nicht. Auch hier wird also deutlich, dass je nach Definition der Zielgröße ein anderes Optimum gefunden wird. Selbst Größen der Produktbildung und Produktkonzentration unterscheiden sich untereinander.

Um in der folgenden Medienoptimierung die Proteinproduktion pro Zelle untersuchen zu können, wird FL_{Spez} als Zielgröße ausgewählt. Entsprechend werden die sich hierauf positiv auswirkenden Komponenten Zink-, Kupfer-, und Ammoniumsulfat sowie Betain (FL_{Spez} rot umrandet in Abbildung 6.16 C) systematisch mit einem evolutiven Algorithmus variiert.

6.3.2 Medienoptimierung

Für die systematische Variation der vier ausgewählten Medienkomponenten wird ein neuartiger Explorationsalgorithmus zur Versuchsplanung und Modellbildung verwendet. Dieser Algorithmus ist ein Hybrid aus quadratischer Regression und einem *Branch-and-Bound* Ansatz (Schweissgut and Wiechert 2010). Im Gegensatz zu typischen globalen Optimierungsalgorithmen berechnet dieser Ansatz sukzessive eine Approximation der Optimierungsfunktion über den ganzen Parameterraum mit steigender Genauigkeit in der Nähe von Optima. Der *Branch*-Teil (*Branch* = Verzweigung) teilt den untersuchten Parameterraum anhand experimenteller Daten wiederholt in Bereiche ein, für die quadratische Regressionen durchgeführt und ein Qualitätskriterium bewertet werden. Der *Bound*-Teil setzt in für die Bereiche Grenzen (*Bound* = Grenze), in denen es sich nicht weiter lohnt erneut Versuchspunkte zu setzen. Das Ergebnis sind einzelne quadratische Approximationen für alle Bereiche, die zusammengekommen einen Überblick über

alle Optima im Parameterraum bieten. Diese Regression wird normalerweise in der statistischen Versuchsplanung (Douglas 2007) verwendet, um die optimale Parameterkombinationen zu ermitteln und ist bisher nicht mit *Branch-and-Bound* Algorithmen kombiniert worden.

Andere evolutive, sich an das Optimum herantastende Prinzipien wurde zur Medienoptimierung erfolgreich mit dem sogenannten genetischen Algorithmus angewandt (Freyer 1992; Link and Weuster-Botz 2006; Weuster-Botz et al. 1997).

Der zweite Teil der hier verwendeten Methode ist der stochastische Teil, der die Entscheidung des Algorithmus festlegt, in welchem Parameterraum ein *Bound* stattfindet und in welchem ein *Branch* stattfindet, was wie der genetische Algorithmus einen evolutives Vorgehen ist. Hierbei wird die Zielgröße (hier FL_{spez}) im untersuchten Parameterraum mit der Response-Surface Methode, also einem quadratischen Modell dargestellt. Diese Regression wird normalerweise in der statistischen Versuchsplanung (Douglas 2007) verwendet, um die optimale Parameterkombinationen zu ermitteln und ist bisher nicht mit *Branch-and-Bound* Algorithmen kombiniert worden.

Der Algorithmus wird dahingehend angepasst, dass 48 Versuche pro Runde durchgeführt werden und damit der maximalen Anzahl paralleler Kultivierungen in einer Flowerplate entsprechen⁷. Die Versuche starten mit einem ersten Set von Experimenten von Kombination der vier Parameter. Anhand dieser Ergebnisse legt der Algorithmus die nächsten Versuchspunkte in nur einem Teil des vorherigen Versuchsraums fest und wertet die Ergebnisse erneut mit einer Response Surface Methode aus. Mit diesem Algorithmus werden die vier Medienkomponenten in 5 Flowerplates mit je 48 Experimenten (47 Versuchspunkte + 1 Referenzkultivierung), also in insgesamt 240 Experimenten untersucht. Die jeweiligen Medienzusammensetzungen werden automatisiert aus Pipettierlisten eingelesen und vom Roboter pipettiert. Die Validierung dieser Medienherstellung ist in Kapitel 5.2.1 beschrieben. Die Ergebnisse von FL_{spez} aller Runden werden für eine Approximation der Optimierungsfunktion verwendet. Diese ist in Abbildung 6.18 vierdimensional dargestellt. Ein Wert von 1 bedeutet dabei ein FL_{spez} entsprechend der jeweiligen Referenzkultivierung (Abbildung 6.18).

Wie auch in der Sensitivitätsanalyse wird eine sich verändernde spezifische GFP-Konzentration FL_{spez} der vier Komponenten deutlich. Ohne die Standardkomponenten Ammoniumsulfat, Nickelsulfat, Kupfersulfat wird FL_{spez} um den Faktor 1.5 gesteigert: Der Effekt des Weglassens einzelner der drei Komponenten wird ebenfalls in den Vorversuchen deutlich. (vgl.

⁷ Algorithmus bereitgestellt von Oliver Schweissgut, Institut für Bio-und Geowissenschaften 1, FZ Jülich

Abbildung 6.16). Alle drei Komponenten sind in dem etablierten Minimalmedium CG XII enthalten und sollten also zur optimierten Proteinproduktion nicht mehr eingesetzt werden.

Dieses optimierte Medium wird folgend als CG ExXII bezeichnet (vgl. Tabelle 6.8). Eine zusätzliche Zugabe von Betain bewirkt keine deutliche Steigerung von FL_{spez} . Neben diesem wurde ein zweites lokales Optimum bei Verdopplung der Ammoniumsulfat- und Zinksulfatkonzentration deutlich. Dieser Wert sollte aber bei der vorliegenden Datenlage als Ausreißer gewertet werden, da nur aufgrund eines einzigen experimentellen Wertes die Regression verfälscht wird (grüner Punkt in Abbildung 6.18).

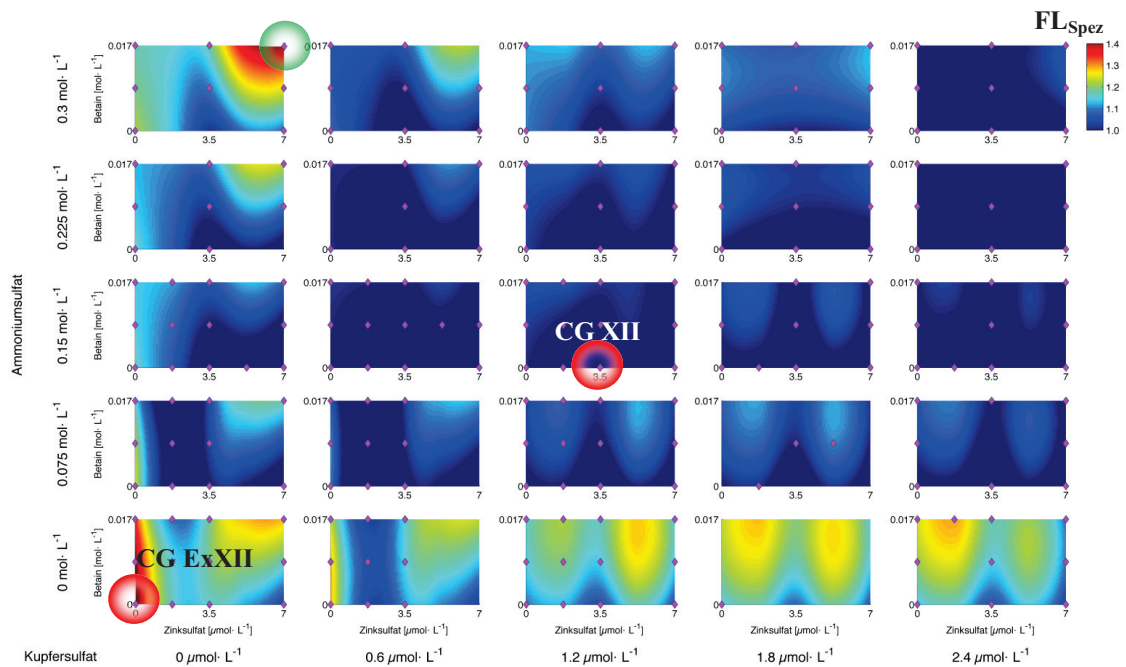


Abbildung 6.18: Medienoptimierung zur sekretorischen Proteinproduktion: 4 Parameter der spezifischen Fluoreszenz bei Glucoselimitation. Rote Markierungen entsprechen den Bedingungen in den Optimierungsexperimenten. Mit Kreisen markierte Medienzusammensetzungen stellten sich als optimal heraus, bzw. entsprechen dem Standardmedium CG XII.

Ohne die Kombination aller drei Parameter, also bei einer OFAT-Analyse wie sie bei den Voruntersuchungen durchgeführt wurde, wäre die optimale Medienkomposition nicht gefunden worden. Hätte man hingegen einen vollfaktoriellen Plan mit fünf Abstufungen für alle vier Medienkomponenten durchgeführt, hätte man ein Set von $5^4 = 625$ Experimenten durchführen müssen. Durch den Branch-and-Bound Algorithmus wird diese Zahl um 62% auf 235 Experimente reduziert. Eine Reduktion der Experimente kann z. B. auch mit einem genetischen Algorithmus erreicht werden. Weuster Botz erreichte mit 13 untersuchten Medienbestandteilen eine verbesserte Lysinausbeute in nur $2 \cdot 236$ anstelle von $2^{13} = 8192$ Versuchen. Durch die Verwendung des genetischen Algorithmus hätte aber ein positiver Ausreißer, wie er in unserem Fall beobachtet wurde, ein „Festklammern“ des Algorithmus, also eine Streuung der weiteren Versuchspunkte um diesen Wert bewirken können. Auch hätte ein lokales Optimum evtl. dazu geführt, dass das tatsächlich höhere, globale Optimum nicht gefunden worden wäre. Für eine Medienoptimierung mit wenigen Parametern stellt der in dieser Arbeit verwendete *Branch-and-Bound* Algorithmus also einen praktikablen Kompromiss zwischen dem genetischen Algorithmus und klassischer statistischer Versuchsplanung dar.

Die Zeit für die manuelle Arbeit konnte durch die automatisierte Medienerstellung mittels Pipettierroboter von 2.5 h auf 0.2 h, also um den Faktor 12.5 je Flowerplate deutlich reduziert werden. Gemeinsam mit dem verwendeten Algorithmus (Zeitersparnis Faktor 2.7) kann hier von einer um den Faktor 33 beschleunigten Medienoptimierung gesprochen werden. Die hier etablierte Methode könnte auch für weitere Zielgrößen oder Produkte angewendet werden. Ob das entwickelte Medium nur für GFP-Produzenten funktioniert, oder auch bei anderen sekretorischen Proteinen wird im folgenden Teilkapitel untersucht.

6.3.3 Validierung des optimierten Mediums mit Cutinase

Das entwickelte CG ExXII Medium wird nachfolgend ebenfalls mit *C. glutamicum* Transformanten getestet, die nicht GFP, sondern Cutinase mit Hilfe des NprE-Signalpeptids sekretieren. Dieser Stamm wird im Schüttelkolben mit dem optimierten (CG ExXII) und dem klassischen Medium (CG XII) untersucht.

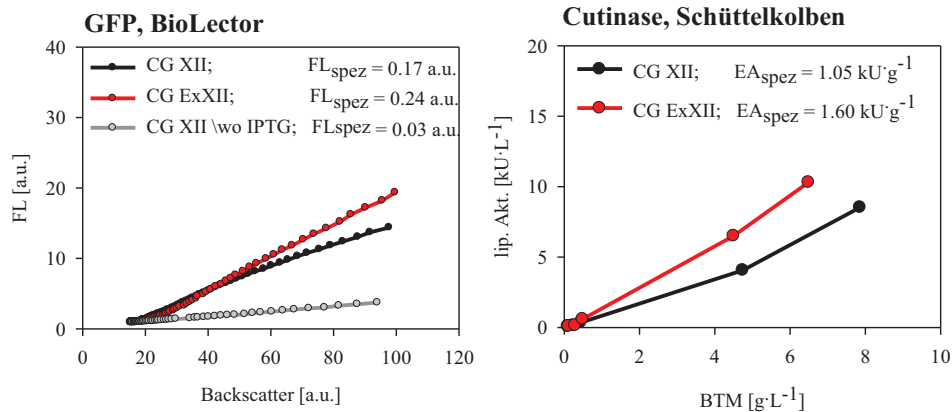


Abbildung 6.19: Übertrag des optimierten CG ExXII Mediums auf ein weiteres Zielprotein: GFP, sekretiert mit phoD als Signalpeptid einer BioLectorkultivierung (links) entspricht den Bedingungen aus den Optimierungsexperimenten. Übertrag auf *C. glutamicum* Cutinase-Produzent mit dem Signalpeptid NprE im Schüttelkolben (rechts).

Um einen Einfluss auf die spezifische Produktbildung zu veranschaulichen, ist das Fluoreszenzsignal des BioLectors über dem Backscattersignal aufgetragen (Abbildung 6.19, links). Die Steigung dieser Auftragung ergibt die Kenngröße FL_{spez} . Auf gleiche Weise sind in Abbildung 6.19, rechts die Werte der Cutinaseproduktion im Schüttelkolben dargestellt. Auch hier entspricht die Steigung der Trendlinie der spezifischen Aktivität EA_{spez} in $kU \cdot g_{BTM}^{-1}$. Als Negativkontrolle der GFP-Produktion ist hier der Ansatz ohne IPTG aufgeführt.

Die spezifische GFP-Bildung wird also mit dem neuen Medium CG ExXII um den Faktor 1.5 gesteigert, was auch schon in Abbildung 6.18 auf Seite 117 zu sehen ist. Die spezifische Cutinasebildung lässt sich in dem CG ExXII Medium ebenfalls um Faktor 1.5 steigern (Abbildung 6.19, rechts). Damit konnte das Ergebnis im optimierten Medium auf ein weiteres Protein übertragen werden.

Es ist weiterhin nicht klar, ob sich für die Cutinaseproduktion bei der Medienoptimierung das gleiche Bild ergeben würde, wie es sich für GFP in Abbildung 6.18 ergibt. Die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf Cutinase mit einem Versuchspunkt sprechen aber für einen allgemeinen positiven Effekt des neu entwickelten Mediums auf die sekretorische Produktion heterologer Proteine in *C. glutamicum*. Welcher physiologische Effekt für eine verbesserte spezifische Ausbeute verantwortlich ist, kann an dieser Stelle nicht geklärt werden. Messwerte der GFP-Produktion in der Medienoptimierung stammen ausschließlich aus der Fluoreszenz-Analytik des BioLectors. Ob

die in CG ExXII verbesserte Fluoreszenz nun aber aus einer verbesserten Expression, Sekretion, Faltung oder einer verbesserten Stabilität entsteht, kann nicht beantwortet werden. Ein alleiniger Einfluss des fluoreszierenden Zentrums, dem Chromophor von GFP ist aber auszuschließen, da sich die Ergebnisse auch auf die nicht-fluoreszierende Cutinase übertragen lassen.

6.3.4 Einfluss der Stickstoffquelle

Das entwickelte Medium CG ExXII bewirkt ohne die Stickstoffquelle Ammoniumsulfat eine verbesserte Proteinproduktion, was aufgrund des starken Stickstoffanteils in Proteinen ein überraschendes Ergebnis ist. Um den Einfluss der Stickstoffquelle genauer zu untersuchen, werden Ammoniumsulfat und Harnstoff, die zweite in CG XII Medium enthaltene Stickstoffquelle untersucht. In dem folgend dargestellten, nachgelagerten Versuchsteil werden diese beiden Stickstoffquellen im CG XII Medium in einem vollfaktoriellen Versuchsplan variiert. Die Kenngrößen FL_{Spez} , μ_{Max} und FL_{GFP} sind in der folgenden *Abbildung 6.20* als Funktion der Konzentration beider Medienkomponenten dargestellt.

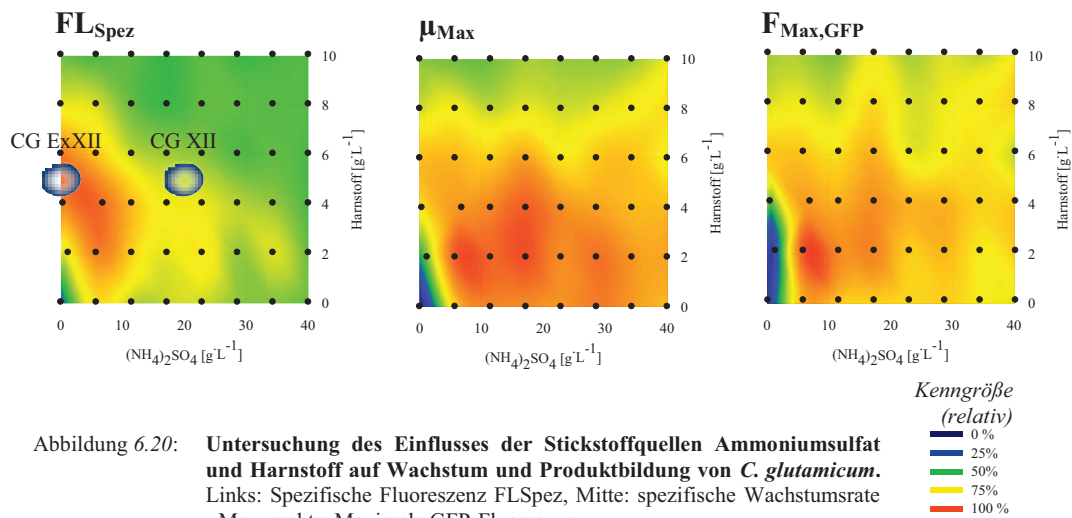


Abbildung 6.20: **Untersuchung des Einflusses der Stickstoffquellen Ammoniumsulfat und Harnstoff auf Wachstum und Produktbildung von *C. glutamicum*.** Links: Spezifische Fluoreszenz FL_{Spez} , Mitte: spezifische Wachstumsrate μ_{Max} , rechts: Maximale GFP-Fluoreszenz.

Wird CG XII kein Ammoniumsulfat sondern $5\ g\ L^{-1}$ Harnstoff zugegeben, liegt eine optimale spezifische Produktbildung vor (Abbildung 6.20, links). Die Ergebnisse bestätigen also, dass sich wie in CG ExXII bei niedriger Ammoniumsulfat-Konzentration der Harnstoff positiv auswirkt. Die optimale GFP-Fluoreszenz FL_{GFP} (nicht biomassespezifisch) stellt sich hingegen bei einer Substratmischung von $5\ g\ L^{-1}$ Ammoniumsulfat und $2\ g\ L^{-1}$ Harnstoff ein (Abbildung 6.20, rechts). Da in diesem Bereich aber verhältnismäßig viel Biomasse produziert wird, hat dies eine

nur suboptimale spezifische Fluoreszenz FL_{Spez} zur Folge. Je nach betrachteter Zielgröße werden also verschiedene Optima gefunden, was zu einem „pareto-optimalen“ Bereich führt. Ähnliches wurde für optimale Biomassebildung und optimale Produktbildung bei der Medienoptimierung von *B. megaterium* beobachtet (David et al. 2010).

Anhand dieser unterschiedlichen Optima wird auch hier deutlich, dass ein wesentlicher Punkt bei einer Medienoptimierung die Definition der Zielgröße ist: erhöhter Produkttiter (hier: FL_{GFP}) ist nicht gleichbedeutend mit viel Protein pro Zelle (c_{Spez} , bzw. EA_{Spez}). Zur Anwendung könnte das Medium in einem zweiphasigen Fed-Batch-Prozess kommen, in dem zuerst in Standardmedium Biomasse anwächst und in der zweiten Phase die Proteinproduktion im neuen CG ExXII Medium erfolgt. Hierzu müsste das erste Medium aus dem Reaktor ausgewaschen werden, damit den Zellen kein Ammoniumsulfat mehr zur Verfügung steht. Dies könnte durch eine am Reaktor befindliche Querstromfiltration stattfinden, wie sie bei Techniken zur Zellrückhaltung in einer kontinuierlichen Kultivierung etabliert sind. Wäre das Medium mit der Zielgröße des Produkttiters FL_{GFP} optimiert worden, so wäre ein für einfache Batchkultivierungen optimales Medium erstellt worden, bei dem Biomassewachstum und Produktbildung in ein und derselben Prozessphase stattfinden.

CG Ex XII ist das in dieser Arbeit neu entwickelte Medium basierend auf dem Minimalmedium für *C. glutamium*, die auf Arbeiten von von der Osten et al. (1989) und Cremer et al. (1988) zurückgehen (s. Tabelle 6.8). Hierbei weichen die meisten Konzentrationen von allen wichtigen Komponenten wie Leitsubstraten (Glucose), Nebensubstraten (Carbonaten, Phosphaten, Stickstoffquellen) und Spurenelemente voneinander ab. Der Einfluss der Komponenten ist in der Literatur nur für einzelne Komponenten näher angegeben (Kimura 1963; Liebl et al. 1989), selten aber für Kombinationen der Medienkomponenten. Die einzig beschriebene systematische Optimierung eines *C. glutamicum*-Minimalmediums fokussiert sich stark auf den Einfluss von Spurenelementen auf die Lysinproduktion (Weuster-Botz et al. 1997). Die Spurenelemente dieser Publikation, die nicht in CG XII enthalten sind, zeigen in den nun vorliegenden Ergebnissen dieser Arbeit keinen Einfluss in den OFAT-Vortests und wurden in der Optimierung nicht weiter untersucht. Analogien der vorliegenden Ergebnisse sind jedoch bei dem Medium zur Proteinproduktion von Ajinomoto zu sehen (Date et al. 2006; Kikuchi et al. 2008b), in welchem wie in dem CG ExXII keine Zink- und Kupfer-Ionen zugegeben werden. Darüber hinaus werden von Ajinomoto ebenfalls keine Calcium- und Nickelionen verwendet, die sich in dieser Arbeit bei den OFAT-Vortests als essentiell herausgestellt hatten. Bei diesen Analysen sind jedoch keine kom-

binatorischen Effekte berücksichtigt. Es ist also möglich, dass die sekretorische Proteinproduktion begünstigt wird, wenn man mehrere Spurenelemente aus dem Medium weglässt. Dieser Effekt zeigte sich auch in dieser Arbeit deutlich bei den kombinatorischen Effekten von Kupfer- und Zink-Ionen. Ebenso deutlich ist aber auch, dass das globale, tatsächliche Optimum der Medienkomponenten zur Proteinsekretion hiermit aller Voraussicht nach nicht gefunden werden konnte.

Tabelle 6.8: Acht verschiedene Minimalmedien für *C. glutamicum*. Grau hinterlegte Komponenten wurden in der Sensitivitätsanalyse untersucht, rot hinterlegte Komponenten wurden mit dem evolutionären Algorithmus optimiert. Abkürzungen: PCA = Protocatechuic acid, PMB = Preculture medium.

	PMB (Osten 1989)	PMB (Kind 2009)	CG C (Schrumpf 1992)	CG X (Cremer 1988)	CorynEx (Date 2006)	CG XII (Keilhauer 1993)	Lysin Prod. (Weuster 1997)	CG Ex XII (Diese Arbeit)
Glucose	20 g	10 g	40 g	40 g	120 g	40 g	100 g	20 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	5 g	15 g	5 g	40 g	30 g	20 g	60 g	
Harnstoff			5 g			5 g	5 g	5 g
KH ₂ PO ₄	1 g	7.7 g	0.5 g	0.5 g	1.5 g	1 g	0.5 g	1 g
K ₂ HPO ₄	8 g	24.98 g	0.5 g	0.5 g		1 g	0.5 g	1 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O		0.2 g	0.25 g	0.25 g	3 g	0.25 g	285 mg	0.25 g
MOPS						42 g		
CaCl ₂	55 mg	47 mg	10 mg			10 mg	0.5 g	10 mg
FeSO ₄ · 7H ₂ O	2 mg	20 mg	10 mg	10 mg	0.03 mg	10 mg	28.5 mg	10 mg
MnSO ₄ · H ₂ O	2 mg	2 mg	10 mg	10 mg	0.03 mg	10 mg	16.5 mg	10 mg
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.5 mg	0.5 mg	1 mg	1 mg		1 mg	6.3 mg	
CuSO ₄	0.2 mg	0.2 mg	0.2 mg	0.2 mg		0.2 mg		
NiCl ₂ · 6H ₂ O			0.02 mg	0.02 mg		0.02 mg	0.043 mg	0.02 mg
Biotin	0.5 mg	0.5 mg	0.2 mg	0.2 mg		0.2 mg	0.85 mg	0.2 mg
PCA		30 mg				7.5 mg		7.5 mg
NaCl	1 g	1 g						
Thiamin	1 mg	1 mg			0.45 mg			
Citrate Na ₃ · 2H ₂ O	1.14 g							
Na ₂ B ₄ O ₇ · 10H ₂ O	0.2 mg	0.2 mg						
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O	0.1 mg	0.1 mg					0.065 mg	
CaCO ₃					50 g			
H ₃ BO ₃							0.05 mg	
CoCl ₂ · 6H ₂ O							0.13 mg	
KAl(SO ₄) ₂ · 12H ₂ O							0.028 mg	
Na ₂ SeO ₃ · 5H ₂ O							0.019 mg	

Auffallend ist bei Betrachtung der Ergebnisse, dass Spurenelemente - also Metallionen - einen Einfluss auf die Proteinsekretion durch die bakterielle Zellwand haben. Zellwände haben eine hohe, negative Ladungsdichte und können dadurch Kationen binden. Einige dieser gebundenen Kationen wie Ca^{2+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} begünstigen die in der Zellwand lokalisierte Prozessierung und Faltung sekretorischer Proteinen wie der α -Amylase und der Levansucrase von *B. subtilis* (Haddaoui et al. 1999; Leloup et al. 1997).

Die variierten Metallionen haben nicht nur Einfluss auf die Nettoladung des Zielproteins, was an sich schon Auswirkungen auf die Sekretionsleistung haben kann, sondern auch auf die Proteine des Sekretionsapparates (Thwaite et al. 2002). Hierdurch kann es zu veränderten Bindungsverhältnissen zwischen den verschiedenen Strukturen wie Zielproteinen, Signalpeptiden, Chaperonen, Proteasen und Translokasen kommen, was sich ebenfalls positiv oder negativ auf die Proteinsekretion auswirken kann. Ein einfaches Ursache-Wirkung-Prinzip ist hier also schwer zu erkennen. Eine experimentelle Bestimmung des Einflusses von Metallionen und deren Kombinationen ist für eine optimale Medienerstellung also unabdingbar.

Dies wird auch an Ansätzen deutlich, die Ergebnisse einer Medienoptimierung mittels genetischer Algorithmen neuen Ansätzen wie der Cofaktoranalyse mittels Genomannotation gegenüberstellen (David et al. 2010). Dabei wird zunächst der Einfluss von Metallionenkonzentrationen auf die Proteinsekretion in *B. megaterium* beschrieben. Die Autoren optimierten mithilfe des genetischen GALOP Algorithmus ein etabliertes Medium und steigerten damit die sekretorische Antikörperproduktion. Es konnte dabei durch Verringern der Co^{2+} - und Ca^{2+} -Ionenkonzentration und durch Erhöhung der Mg^{2+} -Ionenkonzentration die Proteinsekretion gesteigert werden. Die Datenbankanalyse von gelösten und membrangebundenen Proteinen des Stammes und deren Klassifizierung zu den benötigten metallischen Cofaktoren konnte zwar eine gesteigerte Verwendung von Mg^{2+} -Ionen in zellwandgebundenen Proteinen feststellen, der Effekt von Co^{2+} - und Ca^{2+} -Ionen konnte aber durch dieses in-silico-Verfahren nicht vorhergesagt werden.

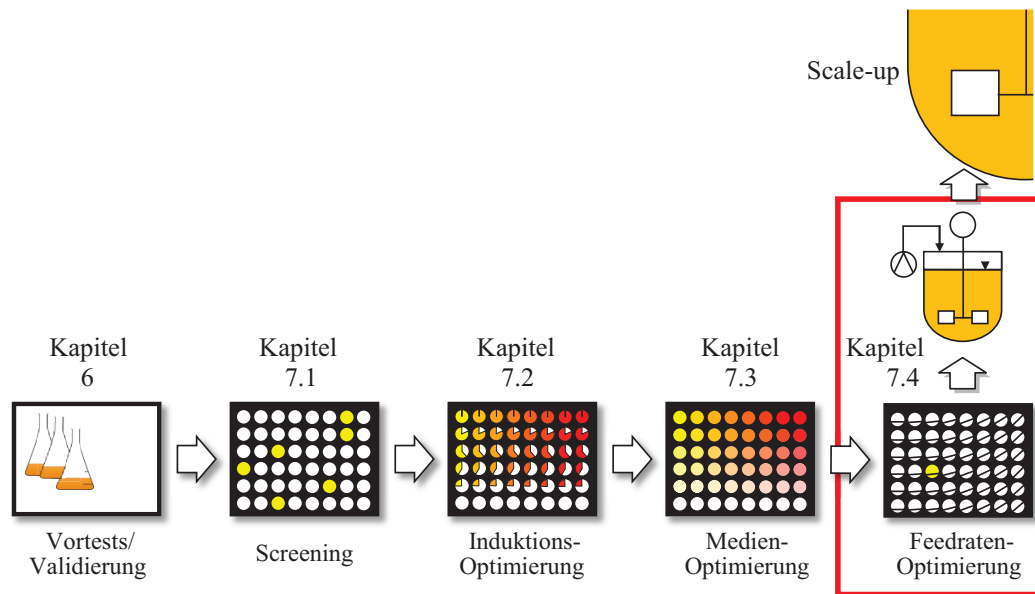


Abbildung 6.21: Abfolge der Optimierungsmodule auf dem JUELICH BIOPROCESS OPTIMIZATION SYSTEM (JuBOS).

6.4 OPTIMIERUNG DER FEEDRATE FÜR *CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM*

Die industrielle Produktion heterologer Proteine wird in der Regel mittels Zulaufverfahren, sogenannte „Fed-Batch“ Prozesse realisiert. Hohe Raum-Zeit-Ausbeuten sind die Vorteile dieser etablierten Prozessführung gegenüber der satzweisen Kultivierung. Eine kontinuierliche Kultivierung zeichnet sich zwar ebenfalls durch eine auf lange Sicht hohe Raum-Zeit-Ausbeute aus, kommt aber, bedingt durch die genetische Instabilität von Produktionsorganismen rekombinanter Proteine, bei der Proteinproduktion selten zum Einsatz.

Ein wichtiger Parameter solcher Fed-Batch-Prozesse ist die Zulauf-oder auch Feedrate der Substratlösung. Diese technische Stellgröße hat direkten Einfluss auf das Biomassewachstum und die (Neben-) Produktbildung. Im folgenden Kapitel werden in Fed-Batch Kultivierungen unterschiedliche Feedraten eingestellt, um so den Einfluss der Substratversorgung auf die sekretori-

sche Proteinproduktion zu prüfen. Desweiteren wird die Möglichkeit einer Durchsatzerhöhung dieses Optimierungsschrittes durch eine enzymatische Glucosefreisetzung in MBRs getestet.

6.4.1 Feed Optimierung im Bioreaktor

Ziel des Versuchs war es, den Einfluss der Substratversorgung in der Feedphase auf die sekretorische Proteinproduktion von *C. glutamicum* zu untersuchen. Hierzu wird die Feedphase eines zweiphasigen Prozesses untersucht (Abbildung 6.22). In der ersten Phase wächst *C. glutamicum* in einer Batchkultur auf 20 g L^{-1} Glucose in CG XII Medium an. Nach Verbrauch der Batchglucose wird ein Glucosefeed durch die lineare oder exponentielle Zufütterung einer Lösung aus 400 g L^{-1} Glucose gelöst in CG XII Medium gestartet. Dabei werden vier verschiedene Feedraten bzw. spezifische Wachstumsraten μ eingestellt, die ein Glucose-limitiertes Wachstum ergeben. Die linearen Feedprofile werden mit drei Produktionsstämmen für Cutinase (SP: NprE, YwmC, YpjP) und einem Leervektorstamm getestet. Die vier exponentiellen Feedprofile werden zur Untersuchung eines Cutinase-Produzenten (SP: NprE) verwendet.

Bei linearer Feedrate wächst *C. glutamicum* nicht wie in einem Batch-Ansatz exponentiell, sondern in Abhängigkeit der Feedrate (Abbildung 6.22, links). Zur Auswertung wird der Erhaltungsstoffwechsel vernachlässigt (Formel 3, S. 17), wodurch mittels linearer Regression die (un-spezifische) Wachstumsrate r_X bestimmt werden kann. Obwohl sich in der Feedphase aufgrund des Erhaltungsstoffwechsels wahrscheinlich kein vollständig lineares Wachstum einstellt, wird diese Abweichung vom linearen Trend bei der Auswertung mittels linearer Regression unter Berücksichtigung des statistischen Fehlers in Kauf genommen.

Bei der Produktbildung wird eine Wachstumsassoziation angenommen. Wenn diese Annahme stimmt, ergäbe sich in Abbildung 6.22 (rechts) eine lineare Abhängigkeit zwischen Cutinaseaktivität (Y-Achse) und Biomassekonzentration. Obwohl die Wertepaare um den linearen Trend streuen, ergeben sich Steigungen der linearen Regression, die alle mit einer Regressionsgüte > 0.85 bestimmt werden können. Aus diesem Grund wird zur Auswertung die Annahme der Wachstums-assoziierten Produktbildung nicht aufgehoben.

An dieser Stelle wird die spezifische Produktbildung näher betrachtet (Tabelle 6.9), welche sich aus der linearen Regression von lipolytischer Aktivität über Biotrockenmasse ergibt (Abbildung 6.22, rechts). Durch diese Annahme lässt sich die spezifische Aktivität EA_{Spez} [$\text{kU} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1}$] durch die Steigung der linearen Regression ausdrücken.

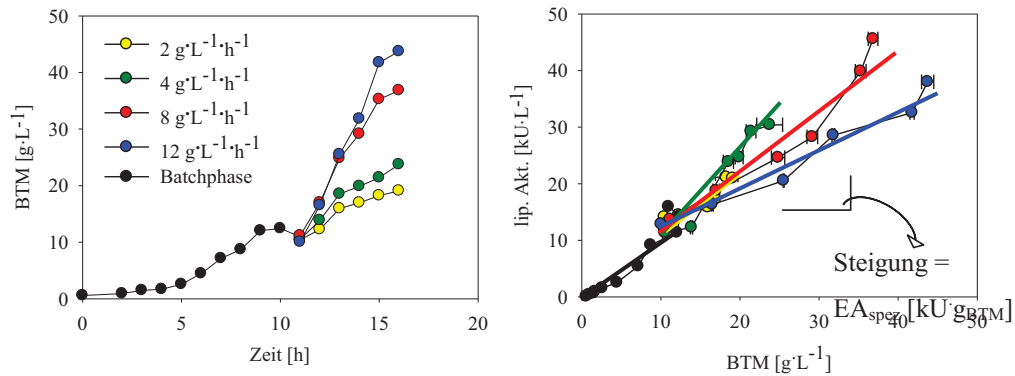


Abbildung 6.22: Fed-Batch in 1 L Bioreaktoren mit vier linearen Feedraten. Links: Biotrockenmasse BTM von *C. glutamicum*, der YpjP-Cutinase produziert, Rechts: lipolytische Aktivität über BTM und lineare Regression zur Berechnung der spezifischen Aktivität (Werte s. Tabelle 6.9. Batchphase mit 20 gL⁻¹ Startglucose (schwarze Punkte). Farbige Datenpunkte entsprechen der Fedbatch-Phase gemessen mit jeweils unterschiedlichen Feedraten: Blau: 12 gL⁻¹h⁻¹ Glucose, Rot: 8 gL⁻¹h⁻¹, Grün: 4 gL⁻¹h⁻¹, Gelb: 2 gL⁻¹h⁻¹.

Tabelle 6.9: Produktbildung mit verschiedenen Fed-Batch Verfahren: Spezifische lipolytische Aktivität EA_{spez} der Cutinase fusioniert mit den Signalpeptiden NprE, YwmC, YpjP in der Phase eines linearen Feedprofils, sowie NprE mit einem exponentiellen Feedphase. (Grafische Darstellung: s. Anhang S. 147). Der Leervektorstamm zeigte bei allen vier Feedraten keine nachweisbare lipolytische Aktivität (Daten nicht gezeigt). Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet mittels linearer Regression aus 6 bis 8 Proben der späten Feedphase. Mittlere spezifische Aktivität der Batchphase in CG XII mit 20 gL⁻¹ Glucose berechnet aus Proben der exponentiellen Phase der Batchkultur (ab 2 gL⁻¹ BTM).

Spezifische lipolytische Aktivität EA _{spez} [kU·g _{BTM} ⁻¹]									
Lineare Feedrate [g·L ⁻¹ ·h ⁻¹]	Linearer Feed						Exponentieller Feed SP:NprE		
	EA _{spez} SP: NprE		EA _{spez} SP: YwmC		EA _{spez} SP: YpjP		μ [h ⁻¹]	EA _{spez}	
2	2.00 ± 0.20		0.78 ± 0.09		1.06 ± 0.17		0.11	1.32 ± 0.07	
4	2.96 ± 0.35		0.78 ± 0.07		1.94 ± 0.32		0.19	0.80 ± 0.09	
8	1.73 ± 0.37		1.52 ± 0.10		1.24 ± 0.17		0.28	0.65 ± 0.04	
12	0.93 ± 0.05		1.01 ± 0.08		0.85 ± 0.11		0.33	0.53 ± 0.14	
Batch	1.38 ± 0.08		0.88 ± 0.08		1.02 ± 0.06				

Die spezifische Produktkonzentration erhöht sich bei mittleren bis niedrigen Feedraten um bis zu einem Faktor 2.1 (NprE-Cutinase) im Vergleich zu Batch-Kultivierungen⁸. Hier zeigt sich je nach gewähltem Signalpeptid ein unterschiedliches Bild: Während die Cutinase mit dem Signalpeptid YwmC bei der zweithöchsten Feedrate ($8 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$) ein Optimum aufweist, haben die NprE- und YpjP-Cutinase bei der zweitniedrigsten Feedrate ($4 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$) ihr Optimum. Durch Einstellen der niedrigsten Feedrate ($2 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$) sowie der höchsten Feedrate ($12 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$) ergab sich aber bei allen drei Signalpeptiden eine verminderte Produktbildung.

In bereits publizierten Prozessoptimierungen der intrazellulären Proteinproduktion in *E. coli* (Turner et al. 1994) werden ebenfalls bei mittleren Feedraten erhöhte Produktivitäten beschrieben. Spätere Untersuchungen auf Omics-Ebene ergaben, dass die Translation bzw. die Anzahl der Ribosomen in dem Fall der limitierende Schritt in der Proteinbiosynthese ist (Neubauer et al. 2003; Sandén et al. 2003). Weitere Publikationen zum Verhalten der Produktbildung bei verschiedenen Feedraten werden von Yee and Blanch (1992) zusammengefasst. Die Autoren konnten jedoch kein konsistentes Bild feststellen. Während einige Autoren eine gesteigerte Produktbildung bei verringerter Wachstumsrate beschreiben (Curless et al. 1990), wird das Gegenteil ebenso beschrieben (Siegel and Ryu 1985). In beiden Publikationen wird die Kopienzahl der Plasmide vor und nach der Induktion als mitentscheidend für eine hohe oder niedrige Produktbildung angegeben. Alle Publikationen haben lediglich die intrazelluläre Proteinproduktion in Abhängigkeit der Wachstumsrate thematisiert.

In Hinblick auf eine verbesserte Sekretion ist der positive Effekt bei geringer Wachstumsrate für Hefen und filamentöse Pilze bekannt (Pakula et al. 2005; Park and Ramirez 1989). Die Proteinsekretion wurde von den Autoren anhand von Markierungsexperimenten bewertet, wodurch nur der Transport über die Membran und dessen Kinetik untersucht wurde. In der vorliegenden Arbeit werden alle zellulären Vorgänge von der Proteinbiosynthese bis hin zur Proteinsekretion als „Black-Box“ betrachtet. Da man aber auch bei diesen Versuchen eine verbesserte Ausbeute bei niedriger Wachstumsrate erkennt, könnte die Proteinsekretion tatsächlich der Engpass während der Kette von Transkription, Translation und Sekretion sein.

Gestützt wird die Hypothese durch die publizierten Mechanismen der Proteinsekretion (Caspers et al. 2010). In diesen Versuchen wurden (in-vitro) effiziente, artifizielle Signalpeptide getestet, die aber zu einer geringen Produktivität in-vivo führten. Als möglichen Grund vermuten

⁸ grafische Darstellung der Ergebnisse s. Anhang S. 144

die Autoren eine Blockierung des Sekretionsweges durch eine „Verstopfung“ der Gram-positiven Zellwand mit translokierten, aber nicht prozessierten und weiterhin zellwandgebundenen Peptiden. Dies könnte ebenfalls eine Begründung für die hier beobachteten Effekte während glucoselimitiertem Wachstum in der Feedphase sein: eine verminderte Glucosezufütterung bewirkt eine ebenfalls verminderte Proteinexpression. Die daraus resultierende niedrige Konzentration intrazellulärer rekombinanter Proteine kann vom Sekretionsapparat besser prozessiert werden, wodurch die extrazelluläre Konzentration rekombinanter Proteine höher ist als bei hohen Expressionsraten. Dadurch könnte eine verminderte Glucoseversorgung bei der Verwendung effizienter Signalpeptide die Blockierung der Zellwand und damit die des Sekretionsweges umgehen.

Dies bedeutet aber auch, dass ein Signalpeptid, welches im Stammscreening (also in Batchkultivierungen) als ineffizient identifiziert wird, nur aufgrund der Sekretionsweg-Blockierung ein falsch-negatives Signal bewirken könnte. Eine Verminderung der Glucoseversorgung, und damit der Expressionsrate, könnte dieses Bottleneck beseitigen und die Sekretion dadurch begünstigen.

Ein im Fed-Batch verändertes Verhalten ganzer Stammsammlungen von Hefen bei der Proteinproduktion (Scheidle et al. 2010) und bei der Biokonversion (Grimm et al. 2012) ist bereits beschrieben. In beiden Publikationen veränderte sich nicht die Produktivität aller Stämme um einen konstanten Faktor, sondern vielmehr das Ranking guter und schlechter Produzenten. Dieses Phänomen zeigt sich in der vorliegenden Arbeit ebenfalls für *C. glutamicum* Cutinaseproduzenten. Wenn der Produktionsprozess später ebenfalls in einem Fed-Batch-Verfahren erfolgt, sollte die Kultivierung zur Stammauswahl also nach Möglichkeit unter glucoselimitierten Bedingungen erfolgen. Dies ist aufgrund des hohen Arbeitsaufkommens nicht in herkömmlichen Bioreaktoren durchführbar.

Generell ist die Feedratenoptimierung aufgrund von Arbeiten in Bioreaktoren ein stets arbeits- und zeitintensiver Optimierungsschritt. Um diese Optimierung zu beschleunigen wurde in dieser Arbeit eine Methode zur Voruntersuchung der Feedrate im MTP-Maßstab getestet. Mit Hilfe dieser im folgenden Kapitel beschriebenen Methode soll geprüft werden, ob neue Stämme in ihrem Produktbildungsverhalten stark sensitiv auf einen veränderten Glucosefeed reagieren.

6.4.2 Feed Screening im BioLector

In den vergangenen 5 Jahren sind verschiedene Möglichkeiten beschrieben worden, in Schüttelkolben oder Mikrotiterplatten eine langsame Glucosefreisetzung zu realisieren. Physikalische Glucosediffusion aus Trägermaterialien, z.B. den Feed-Beads (Jeude et al. 2006) eignen sich zwar hierfür, haben aber den Nachteil, dass die Online-Analytik des BioLectors durch die Trägergele gestört wird. Mikrofluidische Kanäle zur Glucoseversorgung umgehen diese Störung erfolgreich (Funke et al. 2010), sind aber bisher nicht kommerziell erhältlich. Eine dritte Möglichkeit ist die enzymatische Glucosefreisetzung aus löslichen Polymeren (Panula-Perala et al. 2008; Siurkus et al. 2010). Bei dieser Technik werden dem Medium neben dem gelösten Glucosepolymer auch Glucosidasen zugegeben, die mit einer konstanten Rate endständige Glucosemonomere freisetzen. In dieser Arbeit wird ein für *C. glutamicum* optimiertes⁹ und kommerziell erhältliches Medium für *C. glutamicum* verwendet (FIT-Medium von m2p-labs, Aachen/D). In diesem Medium wächst *C. glutamicum* mit pEKEX::nprE-cutinase in einer anfänglichen Batchphase in 900 μL im Substratüberschuss. Das Glucosepolymer ist zu dem Zeitpunkt bereits im Medium enthalten. Wenn die Batchglucose in allen 48 Kultivierungen verbraucht ist (angezeigt durch angestiegenen Gelöstsauerstoff), werden in Duplikaten 24 unterschiedliche Mengen Enzym durch den Pipettierroboter gegeben. Hierfür liegen 24 Verdünnungen der Enzymlösung mit VE-Wasser vor, wodurch das zugegebene Volumen (100 μL) konstant war.

Primäres Ziel dieses Versuchs ist der Nachweis, dass sich die Glucosefreisetzung direkt mit der Enzymmenge einstellen lässt. Sekundäres Ziel ist die Überprüfung, ob sich ein ähnliches Profil der Proteinsekretion bei unterschiedlicher Glucoseversorgung ergibt, wie bereits in Bioreaktoren beobachtet wurde (s. Kapitel 6.4.1).

Man erkennt einen von der Enzymmenge abhängigen Verlauf von Biomasse und Gelöstsauerstoff (Abbildung 6.23, A). Die maximale Biomasseausbeute BTM_{Max} sowie die (unspezifische) Wachstumsrate dc_x/dt (Abbildung 6.23, B) sind abhängig von der eingesetzten Menge an Glucosidasen. Bei hohen Glucosidase-Konzentration werden beide Werte vermindert, bzw. stationär, was sich durch zwei Effekte erklären lässt: Der Verminderung der maximalen Biomasse wird wahrscheinlich durch die gemessene Sauerstofflimitierung verursacht (Abbildung 6.23, A, rechts).

⁹ Entwickelt von Nina Pfelzer, Institut für Bio-und Geowissenschaften 1, FZ Jülich

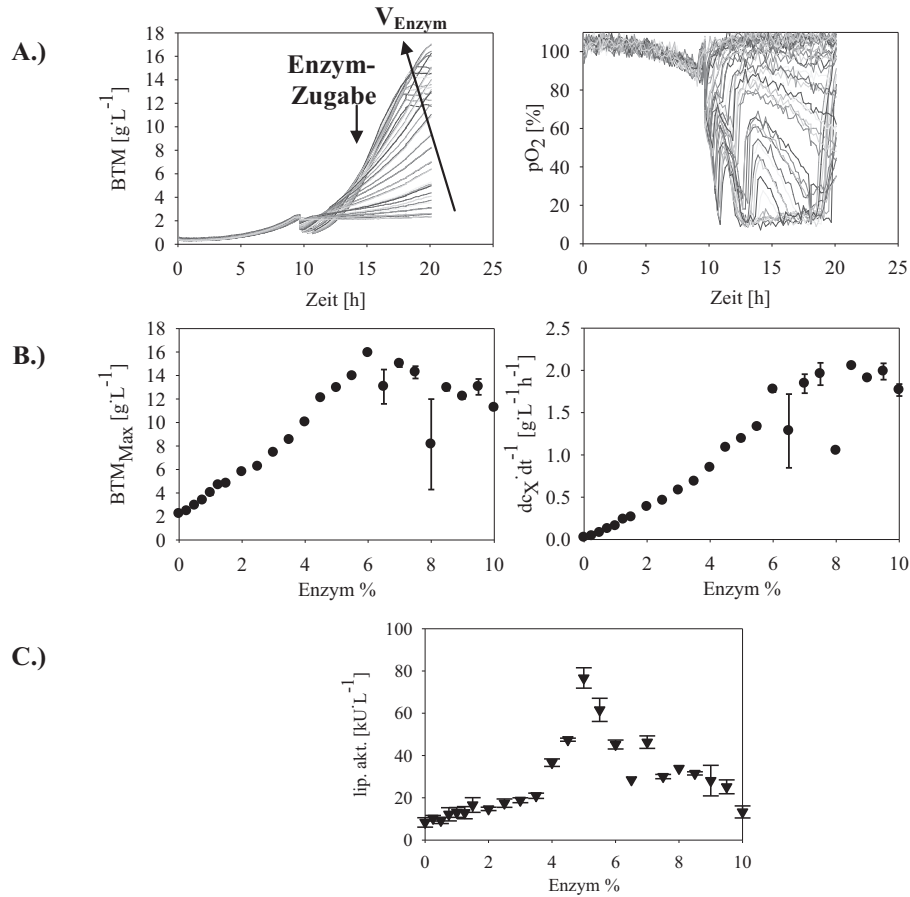


Abbildung 6.23: 48 parallele Mikro-Fed-Batch Ansätze. *C. glutamicum* kultiviert in FIT-Medium mit unterschiedlichen Mengen an Glucosidasen. A.) Biomasse- und Gelöstsauerstoff-Verlauf. B.) Maximale Biomasse (BTM_{Max}, links) und Wachstumsrate $r_x = dx/dt$, rechts). C.) Lipolytische Aktivität im Überstand von abgeernteten Kultivierungen.

Bekanntlich produziert *C. glutamicum* unter diesen Bedingungen vermehrt Nebenprodukt wie Lactat oder Pyruvat (Eggeling and Bott. 2005), was dieses Phänomen erklärt. Die stagnierende (unspezifische) Wachstumsrate r_x ist wahrscheinlich durch einen Glucose-Überschuss verursacht. Durch diesen Glucoseüberschuss wachsen die Zellen mit maximaler Wachstumsrate, die maximale Wachstumsrate wird an dieser Stelle also nicht weiter durch noch mehr Glucosefreisetzung gesteigert. Unterhalb dieser kritischen Glucosidasekonzentration verhält sich aber die Wachstumsrate linear zur eingesetzten Glucosemenge. Dadurch ist das erste Ziel des Versuchsteils erreicht.

Das zweite Ziel ist der Vergleich der Cutinasebildung gegenüber Bioreaktorkultivierungen bei unterschiedlichen Glucosezufütterungen. Von allen 48 Kultivierungen wird die lipolytische Aktivität der Überstände nach 20 h vermessen, um so die Aktivität der sekretierten Cutinase zu bestimmen (Abbildung 6.23, C). Hierbei stellt sich ein prägnantes Optimum bei 5 % v/v zugegebener Enzymlösung heraus. Auch die spezifische Aktivität (EA pro Biotrockenmasse, hier nicht gezeigt) zeigt bei gleicher Enzymmenge ein Optimum. Man erhält also bei diesem Test die Information, dass der Produktionsstamm sich produktiv bei verringerter Feedrate verhält. In welchem Bereich diese optimale Feedrate liegt, lässt sich aus der Enzymmenge nicht direkt ermitteln.

Um also die X-Achse vergleichbar zu herkömmlichen Bioreaktoren zu kalibrieren, kommen verschiedene Vorgehensweisen in Betracht:

- Enzymkinetische Daten: Literaturdaten lassen sich hierbei nicht verwenden, da der exakte Enzymgehalt der Enzymlösung nicht bekannt ist. Eine experimentelle Bestimmung relevanter Parameter in Versuchen im zellfreien Medium ist aufgrund der steigenden Glucosekonzentration problematisch (Daten nicht gezeigt). Der prozesstechnisch interessante Konzentrationsbereich liegt etwa zwischen 0 und 0.5 gL^{-1} , da im Fed-Batch Glucose als limitierendes Substrat verwendet wird. Dieser Konzentrationsbereich ist jedoch durch wiederholte Probenahme experimentell schwer zugänglich. Die Untersuchung der Freisetzungsrates bei höheren Glucosekonzentrationen kann durch Rückreaktionen oder Produktinhibitionen verfälscht werden.
- Berechnung der Glucosefreisetzung mit $Y_{X/S}$ und der unspezifischen Wachstumsrate r_x . Mit einem einfachen Modell lässt sich durch die gebildete Biomasse auf die verbrauchte Glucose rückschließen. Nicht berücksichtigt wird bei dieser Vorgehensweise der wahre Ausbeutekoeffizient, bzw. der Erhaltungsstoffwechsel unter diese Bedingungen. Weiterhin würde ein Vergleich von Freisetzungs- und Feedrate die unterschiedliche Biomasse bei Feedstart aus 5 gL^{-1} Batchglucose im BioLector bzw. 20 gL^{-1} Batchglucose in Bioreaktoren nicht berücksichtigen.
- Für einen Vergleich von Bioreaktor und BioLector wird also die Wachstumsrate auf die Feedstart-Biomasse normiert. Dies ist nach wie vor keine spezifische Wachstumsrate μ , sondern wird an dieser Stelle $r_{x,\text{spez}}$ genannt.

$$r_{X, \text{spez}} = \frac{dX}{dt} \cdot \frac{1}{c_X(\text{Feedstart})} \quad \text{Formel 6.1}$$

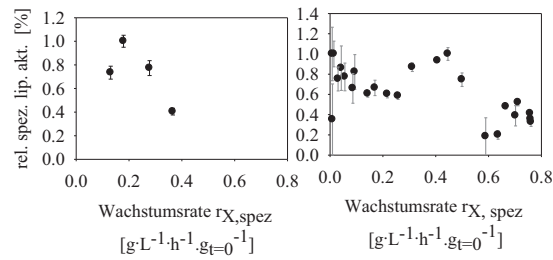


Abbildung 6.24: Vergleich von Fedbatch in Bioreaktoren (links), und Mikrofedbatch im MTPs. Die spezifische lipolytische Aktivität (y-Achse) wurde normiert auf den höchsten Datenpunkt der Datenreihe. Die Wachstumsrate $r_{X, \text{spez}}$ wird wie in Formel 6.1 bestimmt.

Diese Darstellung orientiert sich im Vergleich zu den vorher beschriebenen Vorgehensweisen am ehesten an der experimentellen Datenlage, da hier die Biomassemessung des BioLectors mit einbezogen wird. Bei diesem so durchgeführten Vergleich erkennt man im ähnlichen Wachstumsratenbereich das Optimum der spezifischen lipolytischen Aktivität. Das Medium scheint also zur Voruntersuchung der Sensitivität eines Produzenten gegenüber Glucoselimitation geeignet.

Damit stehen nun verschiedene Methoden bereit, die Proteinexpression anhand der Glucoseversorgung der Fed-Batch-Kultivierung zu steigern. Die klassische Herangehensweise ist die Prozessoptimierung im Bioreaktormaßstab, die in dieser Arbeit bei drei Cutinase-Produzenten eine bis zu Faktor 2.6 gesteigerte spezifische Aktivität führte. Die arbeitsintensive Feed-Optimierung könnte durch eine Voruntersuchung durch das hier gezeigte FIT-Medium im MTP-Maßstab erleichtert werden, um dadurch die Dauer der Bioprozessoptimierung zu verkürzen.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Für eine Optimierung der Proteinproduktion, wird in dieser Arbeit das MBR-System BioLector verwendet. Mit Hilfe dieses Gerätes lassen sich 48 parallele Kultivierungsexperimente bei kontrollierten Bedingungen untersuchen. Dieses Kultivierungssystem wurde in eine Robotik-Anlage integriert, wodurch z.B. eine automatische IPTG-Zugabe oder Probenahme während der Kultivierung durchführbar ist. Durch die Systemintegration weiterer Geräte, wie Zentrifuge und Plattenphotometer, lassen sich auf dieser Plattform mikrobielle Kultivierungen ebenfalls automatisiert vorbereiten und analysieren.

Validierung der automatisierten Kultivierungsplattform für die Proteinproduktion

Die automatisierte Kultivierungsplattform wurde anhand von Tests validiert, die für diese mikrobiellen Arbeiten relevant sind. Hierdurch ist nun die automatisierte Medienerstellung im mL-Maßstab mit einem relativen Fehler von $< 10\%$ möglich. Kalibrierungsexperimente der Online-Analytik des BioLectors ergaben einen großen linearen Messbereich der Biomasse-Analytik für die drei Proteinproduzenten *C. glutamicum* (bis mind. 9 gL^{-1} BTM), *B. subtilis* (bis mind. 6 gL^{-1}) und *E. coli* (bis mind. 8 gL^{-1}).

Die Kultivierungsergebnisse von drei unterschiedlichen *C. glutamicum*-Cutinaseproduzenten ließen sich erfolgreich in den 1 L Maßstab übertragen. Der Unterschied der Biomassebildung zwischen den beiden Reaktorsystemen lag innerhalb des verhältnismäßig niedrigen, statistischen Fehlers der jeweiligen Größe (relative Fehler: $\Delta Y_{X/S} = 8\%$, $\Delta \mu \approx 5\%$). Gleiches wurde für die biomassespezifischen Enzymaktivität EA_{Spez} beobachtet ($\Delta EA_{\text{Spez}} = 7\%$). Die spezifische Produktbildung c_{Spez} wich in einer 15 L Kultivierung (angimpft aus einer anderen Vorkultur) um 15% von den Ergebnissen im 1 L Maßstab ab. Der Scale-up vom 1 L-Maßstab in den 15 L-Maßstab erweist sich also als kritischer, als die Maßstabsvergrößerung vom BioLector in den 1 L Modellbioreaktor. Anhand der Ergebnisse wird deutlich, dass sich die relevanten Kenngrößen zur Proteinproduktion von 1 L Modellbioreaktor auch mit der BioLector-Kultivierung bestimmen lassen.

Auf dieser automatisierten Kultivierungsplattform wurden nach dessen Validierung drei verfahrenstechnische und eine biologische Optimierungsmethode für eine beschleunigte Bioprozessentwicklung der rekombinanten Proteinproduktion und Sekretion entwickelt.

Entwicklung eines Stammscreening-Verfahrens

Die biologische Optimierungsmethode bestand in dieser Arbeit aus der Auswahl von geeigneten Signalpeptid/Zielprotein-Kombinationen für eine optimale Sekretion von Cutinase aus *C. glutamicum*. Anhand von Online-Messungen von z.B. Biomasse des BioLectors wurden Probenahmezeitpunkt und Induktionszeitpunkt des Roboters ausgelöst. Diese „getriggerten“ Pipettiererevents führten zu einem deutlich verringerten Fehler biologischer Replikate bezüglich der Cutinaseproduktion (10% anstelle von 30%). Mit den hier entwickelten Verfahren wurden in einem Proof-of Concept produktive Signalpeptid/Zielprotein-Kombinationen aus 120 Kultivierungen identifiziert. Dabei hatte das Signalpeptid einen starken Einfluss auf die letztliche Sekretion des Zielproteins. Da das effiziente Signalpeptid von dem Zielprotein an sich abhängt, muss für jede neue sekretorische Produktion diese Methode durchgeführt werden. Damit ist die hier entwickelte Screening-Methode ein wichtiges Werkzeug für zukünftige Bioprozessoptimierungen der Proteinproduktion.

Induktionsoptimierung von verschiedenen Modellproteinen

Mit dem von (Huber et al. 2009) entwickelten Induction Profiling werden in dieser Arbeit optimale Kombinationen von IPTG-Konzentration und Induktionszeitpunkt von fünf verschiedene Modellproteinen untersucht. Zwei dieser Modellproteine waren sekretorische Proteine, produziert mit *C. glutamicum* und einem pEKEX2-Vektor. Obwohl dasselbe Stamm-Vektor-System verwendet wurde, wurden im Induktionsprofil verschiedene Optima festgestellt. Darüber hinaus wurde bei der intrazellulären Produktion von drei verschiedenen Proteinen in *E. coli* Unterschiede der optimalen IPTG-Konzentration festgestellt. So erweist sich die Verwendung von leicht zu detektierenden Fluoreszenzproteinen in der Bioprozessoptimierung für andere Proteine als fehlerhaftes Mittel, um die tatsächlichen Optima zu finden. So hätte in diesem Versuchsteil der Übertrag optimaler Induktionsbedingungen von GFP auf die Cutinase einen Ausbeuteverlust von etwa 30%. Die Verwendung eines Fusionskonstrukts von einem Zielprotein (BSLA) mit einem fluoreszierenden Modellprotein (FbFP) erwies sich bei dieser Optimierung als zielführender als die Verwendung von dem Fluoreszenzprotein alleine. Die optimalen Werte der BSLA konnte aber auch mit diesem Fusionskonstrukt nur mit Abweichungen von 10-15% erreicht werden. Dies bedeutet für eine optimale Proteinausbeute eines neu zu produzierenden Proteins auch die Identifizierung der optimalen Induktionsstrategie wiederholt werden sollte.

Medienoptimierung für eine verbesserte Proteinproduktion mit *C. glutamicum*

Auf der Roboterplattform wurde der Einfluss einer Medienoptimierung auf die sekretorische Proteinproduktion mit *C. glutamicum* untersucht. Es wurden in einer Voruntersuchung 4 aus 19 Substanzen identifiziert, die die Produktbildung von sekretiertem GFP (SP: phoD) positiv beeinflussten. Die Konzentrationen dieser vier Parameter (Ammoniumsulfat, Zinksulfat, Kupfersulfat, Betain) wurden mit einem evolutiven Algorithmus in fünf aufeinanderfolgenden MTP-Kultivierungen (je 48 Ansätze) optimiert. In diesem Versuch wurden positive Effekte der Komponenten auf die biomassespezifische Produktbildung beobachtet. Diese Steigerung der GFP-Bildung um den Faktor 1.5 konnte auf die Cutinaseproduktion erfolgreich übertragen werden. Das ermittelte Optimum wäre bei mit einer One-Factor-at-the-time-(OFAT) Analyse nicht ermittelt worden. Unter Berücksichtigung solcher kombinatorischen Effekte konnte der evolutive Algorithmus die Versuchszahl in dieser Medienoptimierung um etwa 60% reduzieren.

Feedratenoptimierung und Feed-Miniaturisierung für MTP-Kultivierungen

Die Feedprofile von drei Cutinaseproduzenten mit unterschiedlichen SP wurden im Bioreaktor optimiert. Die optimale Einstellung linearer und exponentieller Feedraten im Bioreaktor hatte einen deutlichen Einfluss auf die sekretorische Proteinproduktion, die hierdurch um den Faktor 2.8 gesteigert wurde. Die Intensität dieser Steigerung und die jeweils optimale Feedrate hingen jedoch stark von der untersuchten SP/Zielprotein-Kombination ab. Somit müssen die optimalen Feedraten für jede neue SP/Zielprotein-Kombination auch erneut optimiert werden. Um den Durchsatz der arbeitsaufwendigen Feedratenoptimierung zu erhöhen wurde ein enzymatisches Glucosefreisetzungssystem für MTP-Kultivierungen getestet. Mit dieser miniaturisierten Methode wurde der Trend der vermehrten Cutinaseproduktion bei niedrigen Feedraten bestätigt.

Im einfachsten Fall werden diese beschriebenen Optimierungsschritte nacheinander einzeln abgearbeitet. Bei einer solchen Kette von Optimierungsschritten kann durch die halbautomatisierten Arbeitsschritte der Durchsatz einer Bioprozessentwicklung um den Faktor 17 im Vergleich zu klassischen Bioreaktorkultivierungen erhöht werden. Die einzelnen Module hatten in dieser Arbeit Produktivitätssteigerungen von 50% bis 100% zur Folge (vgl. Tabelle 7.1).

Tabelle 7.1: Benötigte Zeit für die Bioprozessoptimierung bei gleicher Versuchsanzahl in parallelen Bioreaktoren und in parallelen MBRs. Berücksichtigt wird die Kultivierungsdauer, sowie Rüst-, Analyse- und Reinigungszeiten.

	Stamm-Screening (100 Klone)	Induktions-Profiling (48 Exp.)	Medien-Optimierung (220 Exp.)	Feedraten-Profiling (48 Exp.)	Total
Entwicklungszeit mit Multifermenter (4)	1 Monat	2 Wochen	2 Monate	3 Wochen	~4 Monate
Entwicklungszeit mit MBRs (48)	3 Tage	1 Tag	2 Wochen	3 Tage	~3 Wochen
Einfluss auf die Cutinaseproduktion	Zwischen 0 und 13 kU·L ⁻¹	Zwischen 0 und 14 kU·L ⁻¹	Steigerung: Faktor 1.5	Steigerung: Faktor 2.1	?

Bioprozessoptimierung um
Faktor 17 beschleunigt

Bei einer solchen Aneinanderreihung der Optimierungsmodule sind die kombinatorischen Effekte der Parameter mitentscheidend. Die Frage ist also, ob es kombinatorische „Rückkopplungen“ der Module untereinander gibt, also ob z. B. ein mittelmäßiger Stamm durch eine für ihn optimale Feedstrategie andere Stämme, die vor der Feedoptimierung besser waren, übertreffen könnte. In dieser Arbeit wurden solche Rückkopplungen bei einigen Ergebnissen der Optimierungen beobachtet (Abbildung 7.1, schwarze Rückkopplungen).

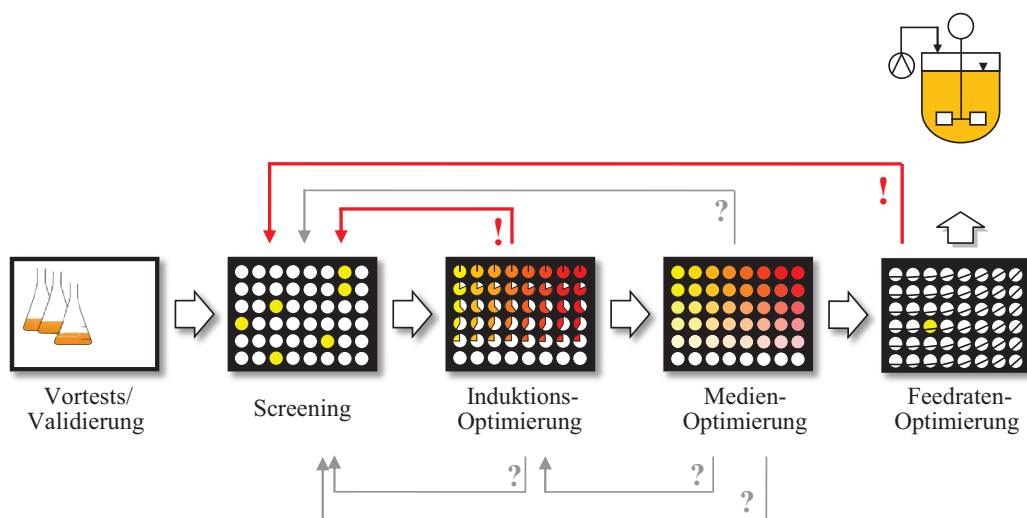


Abbildung 7.1: Rückkopplungen einflussreicher Faktoren auf die Stammauswahl bei Signalpeptiden bei der Abfolge der Optimierungsmodule auf dem JUELICH BIOPROCESS OPTIMIZATION SYSTEM (JUBOS).

So verändert sich z.B. die Abstufung der Signalpeptide YwmC, NprE und YpjP für eine Cutinasesekretion bei unterschiedlichen Feedraten. Das effizienteste SP NprE blieb zwar auch bei veränderter Feedrate nach wie vor optimal, die SP YpjP und YwmC veränderten dabei jedoch die Reihenfolge bezüglich der Cutinaseproduktion. Weiter konnte gezeigt werden, dass die optimale Induktion stark von dem jeweiligen Zielprotein abhing. So ist es also denkbar, dass ein im Stammscreening als mittelmäßig identifizierte Produzenten nach diesem Optimierungsschritt zu besseren oder sogar besten Produzenten werden. Solche zeitintensiven Rückkopplungen in der Kette von Optimierungsmodulen sollte in weiteren Versuchen untersucht werden.

8 AUSBLICK

Die jeweils separat getesteten Optimierungsmodule sollten anhand eines industriell relevanten Enzyms aneinandergereiht durchgeführt werden. Mit einem solche „*Proof-of-Concept*“ könnten innerhalb einer verhältnismäßig kurzen Zeit (3 Wochen) diejenigen verfahrenstechnischen Bedingungen ermittelt werden, die in der Bioreaktorkultivierung zu höherer Produktivität führt.

Bei einem solchen Durchlaufen der Entwicklungskette haben die kombinatorischen Effekte der Optimierungsmodule untereinander sehr wahrscheinlich einen Einfluss auf die letztliche Ausbeute des Produktionsprozesses. In dieser Arbeit wurden in den jeweiligen Optimierungsmodulen nur eine begrenzte Anzahl an Parametern untereinander kombiniert. Zur Entwicklung neuer Optimierungsmethoden sollte der Parameterraum also im Rahmen der experimentellen Möglichkeiten erweitert werden.

Jedoch würde eine Kombination aller untersuchten Parameter (4 Medienkomponenten + Induktionsstärke + Zeitpunkt + Feedrate) in jeweils 5 Abstufungen mit jedem der 173 Signalpeptiden anhand nur eines Zielproteins zu einer Versuchsanzahl von $1.4 \cdot 10^6$ führen (graue Rückkopplungen in Abbildung 7.1). Daher sollten bestehende Optimierungsmethoden nur um einzelne Parameter erweitert werden. So könnte beispielsweise in einer linearen Feedphase zu unterschiedlichen Zeitpunkten und mit unterschiedlichen IPTG-Konzentrationen die Expression des rekombinanten Gens startet werden. Aus der 2-D-Optimierung des Induction Profilings würde damit eine 3-D-Optimierung, bei der die Feedrate ebenfalls variiert wird. Für diesen Ansatz im höheren Durchsatz wäre die Verwendung des enzymatischen Glucosefreisetzungssystems denkbar, um im BioLector lineare Feedraten definiert einzustellen. Um einen richtigen Übertrag der Glucosefreisetzung im mL-Maßstab auf den herkömmlichen Fed-Batch im L-Maßstab zu sichern, sollte die exakte Freisetzungsrates der zur Verfügung stehenden Glucose in Abhängigkeit der zugegebenen Glucosidasen untersucht werden. Dies geschah in dieser Arbeit nur indirekt über das Biomassesignal und einer Berechnung der verbrauchten Glucose über den als konstant angenommenen Ausbeutekoeffizienten $Y_{X/S}$.

Als weitere Parameterkombination könnte mit diesem Fed-Batch-Medium im mL-Maßstab auch das Signalpeptid-Screening bei verschiedenen Glucosefreisetzungsraten untersucht werden. So könnte geprüft werden, wie stark der Einfluss der Glucoseversorgung auf die jeweilige Abstufung unterschiedlicher SP ist. Hierdurch könnte man Hinweise erhalten, ob eine Stammauswahl unter Glucose-limitierenden Bedingungen notwendig ist, wenn das Protein später in Fed-Batch-

Bioreaktoren produziert werden soll. Die Ergebnisse dieser Arbeit geben anhand von drei Signalpeptid/Cutinase-Kombinationen Hinweise darauf, dass sich die Stärke der Feedrate auf die Abstufung der Signalpeptid/Zielprotein-Kombinationen auswirken könnte.

Um in dem eingangs erwähnten „*Proof-of-Concept*“, also einem Durchlaufen der Entwicklungskette, diese kombinatorischen Effekte frühzeitig zu erkennen, sollte jeweils das Verhalten von Referenzstämmen mit berücksichtigt werden. Es sollten also einige Referenzstämmen (z. B. 4) mit unterschiedlichem Produktionsverhalten beim Screening ausgewählt werden. Mit dem besten Stamm wird die verfahrenstechnische Optimierung durchgeführt und unter den für diesen Stamm optimalen Bedingungen anschließend die übrigen drei Stämme untersucht. Verändert sich die Abstufung der Stämme nicht signifikant, so gibt es keine deutlichen Hinweise darauf, dass die neu optimierten Bedingungen kombinatorische Effekte auf die Stammauswahl haben. Ändert sich hingegen die Abstufung signifikant, so sollte die Optimierung mit einem mittelmäßigen Produzenten erneut durchgeführt werden, um ein höheres lokales Optimum auszuschließen oder zu finden. Diese Rückkopplungen in der Bioprozessentwicklung und die damit verbundenen Zeitverluste wären einer so erzielten möglichen Produktivitätssteigerung wirtschaftlich gegenüberzustellen.

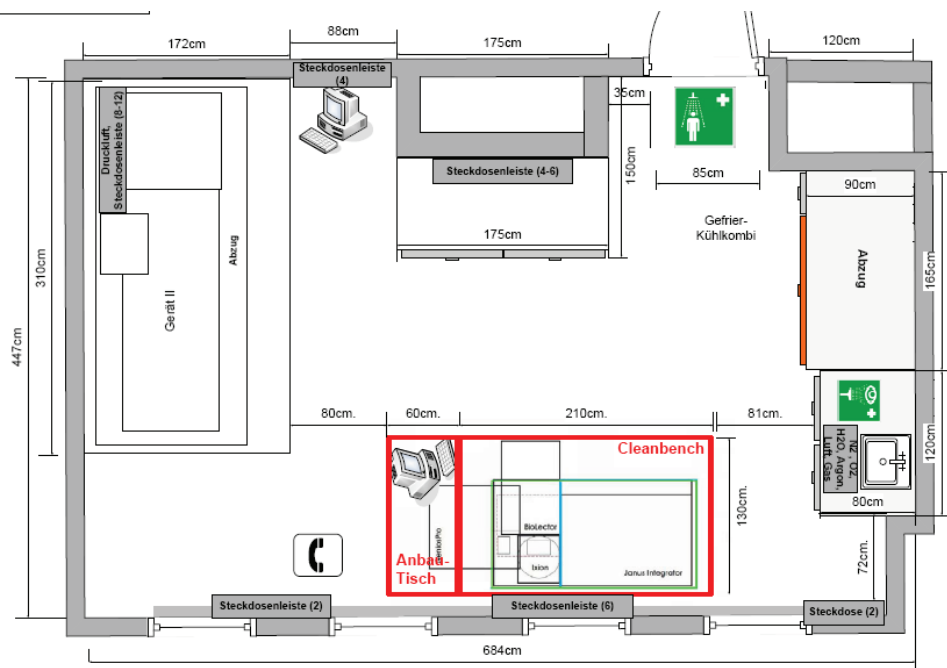
Eine wichtige und noch ausstehende technische Weiterentwicklung der Kultivierungsplattform ist eine flexible und schnelle Verarbeitung der Daten von BioLector, Roboter und Aktivitätsassay. Die hohe Anzahl paralleler Kultivierungsansätze und die Online-Analytik bewirken eine hohe Informationsdichte der Daten innerhalb kurzer Zeit. Die Veranschaulichung dieser Daten anhand z.B. der Berechnung von kultivierungsspezifischer Kenngrößen (μ_{Max} , EA_{spez} , c_{spez}) und deren Visualisierung wären hierbei ein erster Ansatz den Durchsatz zu erhöhen. Der Output dieser automatisierten Auswertung könnte weiterhin als Input für neue Versuchsansätze dienen. Dies wurde in dieser Arbeit bereits in der evolutiven Medienoptimierung mit BS und GFP-Signalen so gehandhabt, sollte aber noch auf die Daten der Aktivitätsassays ausgeweitet werden.

Die Bestimmung von skalierbaren Kenngrößen mit der entwickelten Anlage ist nicht an das Ziel der heterologen Proteinproduktion gebunden, sondern kann Anwendung in weiteren Bereichen der Stammcharakterisierung und zur Bioprozessentwicklung finden. Je nach Produktklasse können hier MTP basierte Assays oder andere HT-Analytik Engpässe seitens der Produktanalytik verhindern. Da bei der Stamm- und Bioprozessentwicklung Techniken wie z.B. die „Random Mutagenesis“ nach wie vor breite Anwendung finden, wird der hohe Bedarf an solchen Techniken mit erhöhtem Durchsatz nach wie vor steigen.

9 ANHANG

9.1 LABORPLANUNG FÜR DIE ROBOTIK

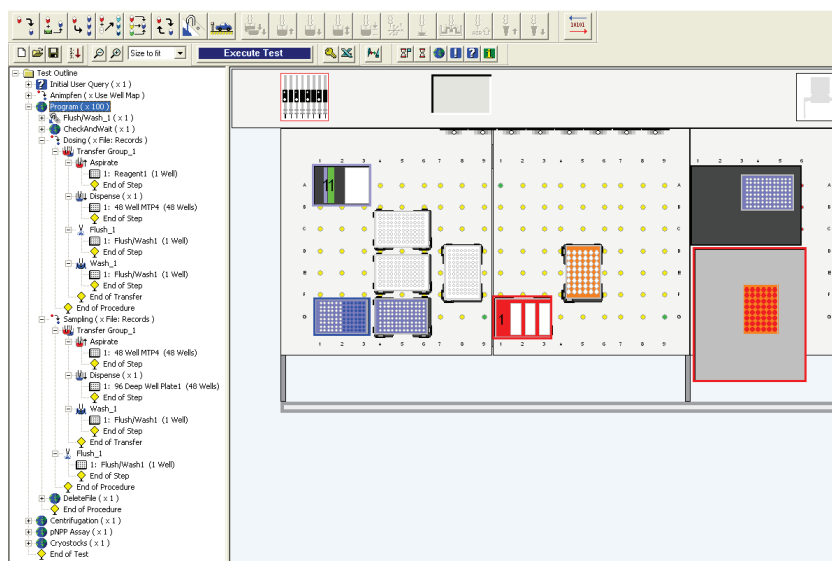
In Kapitel 5.1 (S. 47ff) wird die Konzeption und der Aufbau der automatisierten Kultivierungsplattform beschrieben. Die Anlage steht zusammen mit einer zweiten Robotik-Plattform in einem Labor, welches zu Beginn der Arbeit neu eingerichtet wurde. Die Planung des Laboraufbaus entstand dabei im Dialog der Anlagenverantwortlichen mit technischen Einheiten des Forschungszentrum Jülichs.



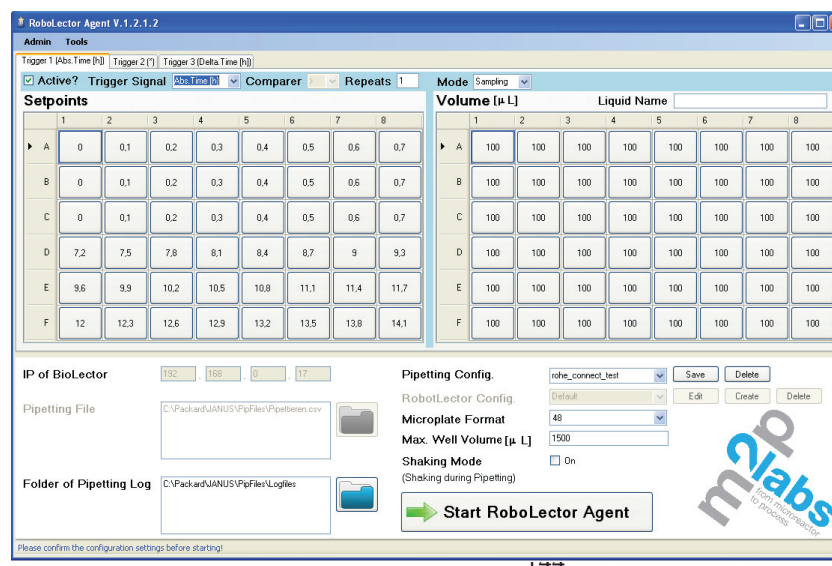
Anhang Abb. 1: Planung des Roboterlabors R 307 des IBG-1. Rot umrandeter Bereich ist die Cleanbench. Planung und Konzeption erfolgte in Zusammenarbeit mit Roland Moussa (IBG-1, AG Biokatalyse und Biosensoren) und technischen Einheiten des Forschungszentrum Jülich. Verwendete Software: MS Visio.

9.2 SCREENSHOTS DER SOFTWARE

In Kapitel 5.1.3 wird die Softwarestruktur zur Ansteuerung der automatisierten Instrumente des JUBOS dargestellt. Hier im Anhang werden als Zusatzinformationen zwei Screenshots von zwei wesentlichen Programmen aufgeführt. In *Anhang Abb. 2* die Software WinPrep zur Steuerung des Roboters, in *Anhang Abb. 3* die Software *RoboLector Agent* zur Kommunikation zwischen BioLector und Roboter.



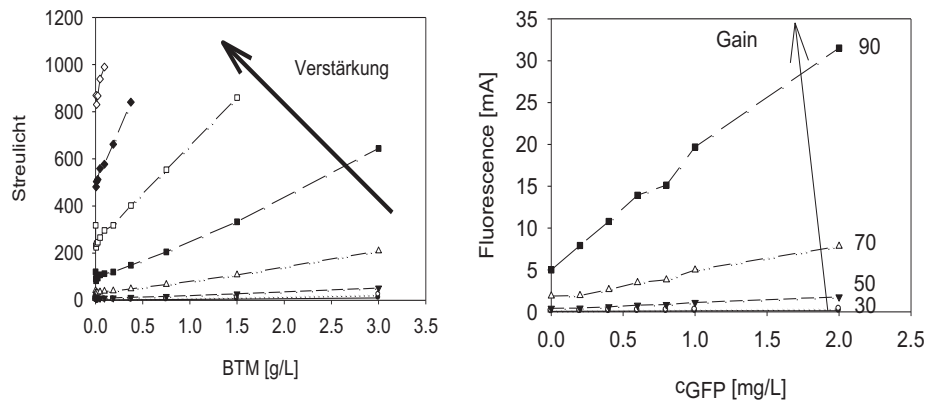
Anhang Abb. 2: Screenshot der WinPrep-Methode für getriggerte Pipettierevents. Linke Liste ist die Chronologie der einzelnen Befehle an den Roboter, rechts die schematische Deck-Ansicht von oben zur Positions-Definition von MTP und Instrumenten.



Anhang Abb. 3: Screenshot der RoboLector-Software. Interface zur Kommunikation zwischen Roboter und BioLector, sowie zur Einstellung der getriggerten Pipettierevents.

9.3 EINFLUSS DES GAINS AUF DIE ONLINE-ANALYTIK

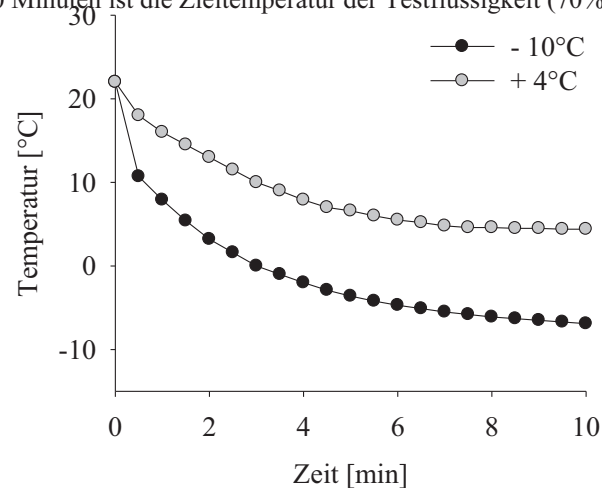
In Kapitel 5.2.2 (S. 63ff) sind die Ergebnisse der Kalibrierung der Online-Analytik bei Gain 20 (Backscatter), bzw. Gain 60 (Fluoreszenz) dargestellt. Gain bedeutet hierbei die Verstärkung der Signalverstärkung des BioLectors. Diese Signalverstärkung ist vom Experimentator frei wählbar. In den folgenden Abbildungen ist der Einfluss einer Veränderung des Gains auf die Messung einer Verdünnungsreihe von C.glutamicum-Zellen bzw. von GFP-Standard dargestellt.



Anhang Abb. 4: Einfluss der Signalverstärkung (Gain) auf die Online-Analytik des BioLectors. Links: Messung einer Verdünnungsreihe von C.glutamicum-Zellen bei Gains zwischen 0 und 90. Rechts: Messung einer Verdünnungsreihe von GFP-Standard bei Gains zwischen 30 und 90.

9.4 KÜHLUNG VON FLÜSSIGKEITEN AUF DEM ROBOTER-DECK

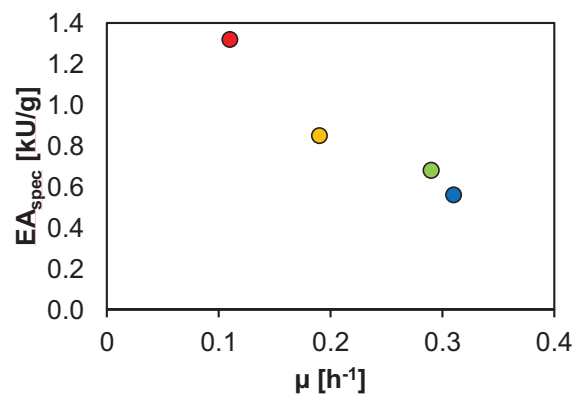
In Kapitel 5.2.3 (S. 73) wird der Einfluss der Lagerungsbedingungen auf die Cutinaseaktivität gezeigt. Aus dem BioLector entnommene Proben werden in einer Deepwell-Platte (DWP) gelagert, die über einen passenden Adapter von einem Umwälzkühler temperiert werden kann. Biologische Proben werden in dieser Arbeit bei 4°C gekühlt. Prinzipiell ist eine Kühlung bis -10°C möglich. Der Geschwindigkeit des Wärmeübertrags ist in der folgenden Abbildung dargestellt. Nach 7 bzw. 10 Minuten ist die Zieltemperatur der Testflüssigkeit (70% Ethanol) erreicht.



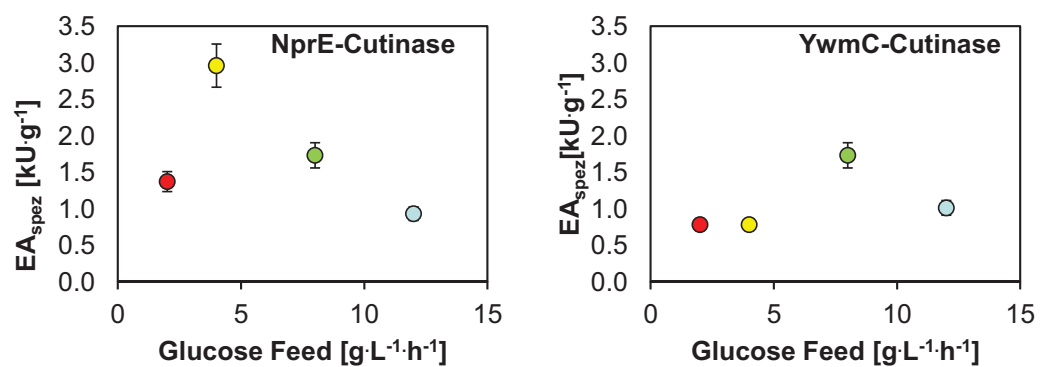
Anhang Abb. 5: Temperaturverlauf in gekühlten 70% Ethanol in DWP auf dem Roboterdeck.

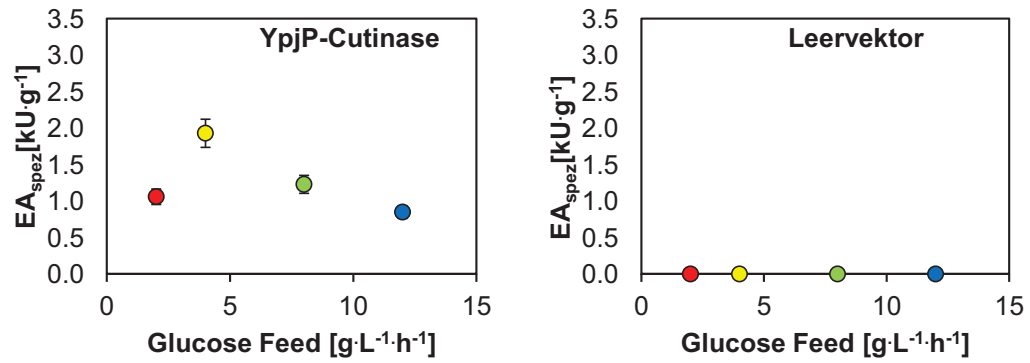
9.5 DIAGRAMME: OPTIMIERUNG DER FEEDRATE

In Tabelle 6.9 (Kapitel 6.4.1, S. 126) wurden die Werte der spezifischen Cutinase-Aktivität in Abhängigkeit von der linearen Feedrate, bzw. in exponentiellem Feedprofil von der spezifischen Wachstumsrate μ aufgeführt. Zusätzlich dazu werden hier im Anhang die Daten in Diagrammen veranschaulicht.



Anhang Abb. 6: Einfluss der spezifischen Wachstumsrate in exponentiellen Fedbatch-Profilen auf die biomassespezifische Enzymaktivität EA_{spez} der Cutinase in NprE-Cutinase produzierenden *C.glutamicum*.





Anhang Abb. 7: Einfluss der linearen Feedrate auf die biomassespezifische Enzymaktivität EA_{spez} der Cutinase in vier *C. glutamicum*-Stämmen. Unterschied der Stämme ist das an die Cutinase fusionierte Signalpeptid (NprE, YwmC, YpjP, Leervektorstamm)

10 LITERATURVERZEICHNIS

- Aggteleky B. 1982. Fabrikplanung. Werksentwicklung und Betriebsrationalisierung. München–Wien: Carl Hanser Verlag.
- Ahn WS, Ahn JY, Jung CH, Hwang KY, Kim EE, Kim J, Im H, Kim JO, Yu MH, Lee C. 2007. Optimization of expression conditions for soluble protein by using a robotic system of multi-culture vessels. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 17(11):1868-1874.
- Albano CR, Randers-Eichhorn L, Bentley WE, Rao G. 1998. Green fluorescent protein as a real time quantitative reporter of heterologous protein production. *Biotechnology Progress* 14(2):351-354.
- Amanullah A, Otero JM, Mikola M, Hsu A, Zhang JY, Aunins J, Schreyer HB, Hope JA, Russo AP. 2010. Novel Micro-Bioreactor High Throughput Technology for Cell Culture Process Development: Reproducibility and Scalability Assessment of Fed-Batch CHO Cultures. *Biotechnology and Bioengineering* 106(1):57-67.
- Anderlei T, Zang W, Papaspyrou M, Büchs J. 2004. Online respiration activity measurement (OTR, CTR, RQ) in shake flasks. *Biochemical Engineering Journal* 17(3):187-194.
- Arnold S, Siemann M, Scharnweber K, Werner M, Baumann S, Reuss M. 2001. Kinetic modeling and simulation of in vitro transcription by phage T7 RNA polymerase. *Biotechnology and Bioengineering* 72(5):548-561.
- Balbas P. 2001. Understanding the art of producing protein and nonprotein molecules in *Escherichia coli*. *Molecular Biotechnology* 19(3):251-267.
- Baneyx F. 1999. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology* 10(5):411-421.
- Baneyx F, Mujacic M. 2004. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology* 22(11):1399-1408.
- Bayer K, Cserjan-Puschmann M, Grabherr R, Striedner G, Clementschitsch F. 2002. Optimizing Recombinant Microbial Fermentation Processes: An Integrated Approach. *Biopharm - The Applied Technologies of Biopharmaceutical Development* 15:26-34.
- Berks BC, Palmer T, Sargent F. 2003. The Tat protein translocation pathway and its role in microbial physiology. *Advances in Microbial Physiology: Academic Press.* p 187-254.

- Berrow NS, Bussow K, Coutard B, Diprose J, Ekberg M, Folkers GE, Levy N, Lieu V, Owens RJ, Peleg Y and others. 2006. Recombinant protein expression and solubility screening in *Escherichia coli*: a comparative study. *Acta Crystallographica D Biol Crystallogr* 62(Pt 10):1218 - 1226.
- Bertani G. 1951. Studies on Lysogenesis I. *Journal of Bacteriology* 62(3):293-300.
- Betts JJ, Baganz F. 2006. Miniature bioreactors: current practices and future opportunities. *Microbial Cell Factories* 5(21).
- Billman-Jacobe H, Wang L, Kortt A, Stewart D, Radford A. 1995. Expression and secretion of heterologous proteases by *Corynebacterium glutamicum*. *Applied and Environmental Microbiology* 61(4):1610-3.
- Blobel G. 2000. Protein Targeting (Nobel Lecture). *ChemBioChem* 1(2):86-102.
- Bolten CJ, Kiefer P, Letisse F, Portais JC, Wittmann C. 2007. Sampling for metabolome analysis of microorganisms. *Analytical Chemistry* 79(10):3843-3849.
- Borchert TV, Nagarajan V. 1991. Effect of signal sequence alterations on export of levansucrase in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 173:276-282.
- Braun P, LaBaer J. 2003. High throughput protein production for functional proteomics. *Trends in Biotechnology* 21(9):383-388.
- Brennan PJ, Nikaido H. 1995. The Envelope of Mycobacteria. *Annual Review of Biochemistry* 64(1):29-63.
- Brockmeier U. 2006. New strategies to optimize the secretion capacity for heterologous proteins in *Bacillus subtilis* (Disseration). Bochum: Ruhr-Universität Bochum.
- Brockmeier U, Caspers M, Freudl R, Jockwer A, Noll T, Eggert T. 2006a. Systematic screening of all signal peptides from *Bacillus subtilis*: a powerful strategy in optimizing heterologous protein secretion in Gram-positive bacteria. *Journal of Molecular Biology* 362(3):393-402.
- Brockmeier U, Wendorff M, Eggert T. 2006b. Versatile Expression and Secretion Vectors for *Bacillus subtilis*. *Current Microbiology* 52(2):143-148.
- Buchholz K, Kasche V, Bornscheuer UT. 2005. Introduction to Enzyme Technology. *Biocatalysts and Enzyme Technology*. Weinheim: Wiley-VCH. p 1-26.
- Büchs J. 2001. Introduction to advantages and problems of shaken cultures. *Biochem Eng J* 7(2):91 - 98.

- Büchs J, Lotter S, Milbradt C. 2001. Out-of-phase operating conditions, a hitherto unknown phenomenon in shaking bioreactors. *Biochemical Engineering Journal* 7(2):135-141.
- Büchs J, Maier U, Milbradt C, Zoels B. 2000. Power consumption in shaking flasks on rotary shaking machines: II. Nondimensional description of specific power consumption and flow regimes in unbaffled flasks at elevated liquid viscosity. *Biotechnology and Bioengineering* 68(6):594-601.
- Busso D, Stierlé M, Thierry J-C, Moras D. 2008. Automated Recombinant Protein Expression Screening in *Escherichia coli* Structural Proteomics. In: Kobe B, Guss M, Huber T, editors: Humana Press. p 175-186.
- Bylund F, Guillard F, Enfors SO, Trägårdh C, Larsson G. 1999. Scale down of recombinant protein production: a comparative study of scaling performance. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 20(5):377-389.
- Caspers M, Brockmeier U, Degering C, Eggert T, Freudl R. 2010. Improvement of Sec-dependent secretion of a heterologous model protein in *Bacillus subtilis* by saturation mutagenesis of the N-domain of the AmyE signal peptide. *Applied Microbiology and Biotechnology* 86(6):1877-1885.
- Chaddock AM, Mant A, Karnauchov I, Brink S, Herrmann RG, Klösgen RB, Robinson C. 1995. A new type of signal peptide: central role of a twin-arginine motif in transfer signals for the delta pH-dependent thylakoidal protein translocase. *EMBO Journal* 14(12):2715-2722.
- Chae HJ, DeLisa MP, Cha HJ, Li JC, Weigand WA, Valdes JJ, Rao G, Bentley WE. 2000a. On-line optimization and control of recombinant protein expression in high cell density *Escherichia coli* cultures using GFP-fusion monitoring. Abstracts of Papers of the American Chemical Society 219:U213-U213.
- Chae HJ, DeLisa MP, Cha HJ, Weigand WA, Rao G, Bentley WE. 2000b. Framework for online optimization of recombinant protein expression in high-cell-density *Escherichia coli* cultures using GFP-fusion monitoring. *Biotechnology and Bioengineering* 69(3):275-285.
- Chisti Y. 1993. Animal cell culture in stirred bioreactors: observations on scale-up. *Process Biochemistry* 28(8):511-517.
- Choi JH, Lee SY. 2004. Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 64(5):625-635.
- Coker AK. 2007. Ludwig's Applied Process Design for Chemical Petrochemical Plants, : Elsevier. 1031 p.
- Cooney CL. 1983. Bioreactors: Design and Operation. *Science* 219(4585):728-733.

- Cremer J, Treptow C, Eggeling L, Sahm H. 1988. Regulation of Enzymes of Lysine Biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of General Microbiology* 134(12):3221-3229.
- Curless C, Pope J, Tsai L. 1990. Effect of preinduction specific growth rate on recombinant alpha consensus interferon synthesis in *Escherichia coli*. *Biotechnology Progress* 6(2):149-152.
- Date M, Itaya H, Matsui H, Kikuchi Y. 2006. Secretion of human epidermal growth factor by *Corynebacterium glutamicum*. *Letters in Applied Microbiology* 42(1):66-70.
- David F, Westphal R, Bunk B, Jahn D, Franco-Lara E. 2010. Optimization of antibody fragment production in *Bacillus megaterium*: The role of metal ions on protein secretion. *Journal of Biotechnology* 150(1):115-124.
- Degering C, Eggert T, Puls M, Bongaerts J, Evers S, Maurer KH, Jaeger KE. 2010. Optimization of Protease Secretion in *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* by Screening of Homologous and Heterologous Signal Peptides. *Applied and Environmental Microbiology* 76(19):6370-6376.
- DeLisa MP, Tullman D, Georgiou G. 2003. Folding quality control in the export of proteins by the bacterial twin-arginine translocation pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100(10):6115-6120.
- Doig SB, F; Lye, GL. 2006. High throughput screening and process optimisation. In: Ratledge CK, B editor. *Basic Biotechnology*. 3 ed.
- Doig SD, Pickering SCR, Lye GJ, Baganz F. 2005. Modelling surface aeration rates in shaken microtitre plates using dimensionless groups. *Chemical Engineering Science* 60(10):2741-2750.
- Donovan RS, Robinson CW, Glick BR. 1996. Review: optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the lac promoter. *Journal of Industrial Microbiology* 16(3):145 - 154.
- Douglas CM. 2007. *Design and Analysis of Experiments*. John Wiley & Sons Inc.
- Dragosits M, Frascotti G, Bernard-Granger L, Vazquez F, Giuliani M, Baumann K, Rodriguez-Carmona E, Tokkanen J, Parrilli E, Wiebe MG and others. 2011. Influence of Growth Temperature on the Production of Antibody Fab Fragments in Different Microbes: A Host Comparative Analysis. *Biotechnology Progress* 27(1):38-46.
- Drepper T, Eggert T, Circolone F, Heck A, Krauss U, Guterl JK, Wendorff M, Losi A, Gartner W, Jaeger KE. 2007. Reporter proteins for in vivo fluorescence without oxygen. *Nature Biotechnology* 25(4):443 - 445.

- Dübel S, Breitling F, Klewinghaus I, Little M. 1992. Regulated secretion and purification of recombinant antibodies in *E. coli*. *Cell Biochemistry and Biophysics* 21(1):69-79.
- Duetz WA. 2007. Microtiter plates as mini-bioreactors: miniaturization of fermentation methods. *Trends in Microbiology* 15(10):469 - 475.
- Dyrløv Bendtsen J, Nielsen H, von Heijne G, Brunak S. 2004. Improved Prediction of Signal Peptides: SignalP 3.0. *Journal of Molecular Biology* 340(4):783-795.
- Eggeling L, Bott. M. 2005. Handbook of *Corynebacterium glutamicum*. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Eikmanns BJ, Kleinertz E, Liebl W, Sahm H. 1991. A family of *Corynebacterium glutamicum*/*Escherichia coli* shuttle vectors for cloning, controlled gene expression, and promoter probing. *Gene* 102(1):93-98.
- Eversheim WS, Günther 2000. Produktion und Management. Betriebshütte. Berlin: Springer 1888 p.
- FDA. 2007. Pharmaceutical Quality for the 21st Century A Risk-Based Approach Progress Report.
- Fieschko J, Ritch T, Bengston D, Fenton D, Mann M. 1985. The Relationship Between Cell Dry Weight Concentration and Culture Turbidity For A Recombinant E. Coli K12 Strain Producing High Levels of Human Alpha Interferon Analogue. *Biotechnology Progress* 1(3):205-208.
- Fox EA, Gex VE. 1956. Single-phase blending of liquids. *Aiche Journal* 2(4):539-544.
- Franco-Lara E, Link H, Weuster-Botz D. 2006. Evaluation of artificial neural networks for modelling and optimization of medium composition with a genetic algorithm. *Process Biochemistry* 41(10):2200-2206.
- Freyer SW-B, D; Wandery, C 1992. Medium optimisation using genetic algorithms. *Bioengineering* 8(5/6):16-25.
- Funke M, Buchenauer A, Schnakenberg U, Mokwa W, Diederichs S, Mertens A, Muller C, Kensy F, Buchs J. 2010. Microfluidic BioLector-Microfluidic Bioprocess Control in Microtiter Plates. *Biotechnology and Bioengineering* 107(3):497-505.
- Funke M, Diederichs S, Kensy F, Muller C, Buchs J. 2009. The baffled microtiter plate: increased oxygen transfer and improved online monitoring in small scale fermentations. *Biotechnology and Bioengineering* 103(6):1118 - 1128.

- Funke SA, Eipper A, Reetz MT, Otte N, Thiel W, Van Pouderoyen G, Dijkstra BW, Jaeger K-E, Eggert T. 2003. Directed Evolution of an Enantioselective *Bacillus subtilis* Lipase. *Biocatalysis and Biotransformation* 21(2):67 - 73.
- Gies WJ. 1919. Studies on Elective Localization: Focal Infection, with Special Reference to Oral Sepsis. *Journal of Dental Research* 1(4):519-522.
- Grimm T, Grimm M, Klat R, Neubauer A, Palela M, Neubauer P. 2012. Enzyme-based glucose delivery as a high content screening tool in yeast-based whole-cell biocatalysis. *Applied Microbiology and Biotechnology*:1-7.
- Gustafsson C, Govindarajan S, Minshull J. 2004. Codon bias and heterologous protein expression. *Trends in Biotechnology* 22(7):346-353.
- Haddaoui E, Chambert R, Petit-Glatron MF, Lindy O, Sarvas M. 1999. *Bacillus subtilis* alpha-amylase: the rate limiting step of secretion is growth phase-independent. *Fems Microbiology Letters* 173(1):127-131.
- Hallborn J, Carlsson R. 2002. Automated screening procedure for high-throughput generation of antibody fragments. *Biotechniques* 33:30-7.
- Harwood CR, Cranenburgh R. 2008. *Bacillus* protein secretion: an unfolding story. *Trends in Microbiology* 16(2):73-79.
- Hermann T. 2003. Industrial production of amino acids by coryneform bacteria. *Journal of Biotechnology* 104(1-3):155-172.
- Hoffmann F, Rinas U. 2004. Roles of Heat-Shock Chaperones in the Production of Recombinant Proteins in *Escherichia coli* Physiological Stress Responses in Bioprocesses. Springer Berlin / Heidelberg. p 143-161.
- Huber R, Ritter D, Hering T, Hillmer A-K, Kensy F, Muller C, Wang L, Buchs J. 2009. Robo-Lector - a novel platform for automated high-throughput cultivations in microtiter plates with high information content. *Microbial Cell Factories* 8(1):42.
- Hust M, Steinwand M, Al-Halabi L, Helmsing S, Schirrmann T, Dübel S. 2009. Improved microtitre plate production of single chain Fv fragments in *Escherichia coli*. *New Biotechnology* 25(6):424-428.
- Hwang SO, Feldberg RS. 1990. Effect of inclusion body production on culture turbidity and cell dry weight in growing bacterial cultures. *Biotechnology Progress* 6(1):48-50.
- Ian H. 2005. From gene to protein: a review of new and enabling technologies for multi-parallel protein expression. *Protein Expression and Purification* 40(1):1-22.

- Isett K, George H, Herber W, Amanullah A. 2007. Twenty-four-well plate miniature bioreactor high-throughput system: assessment for microbial cultivations. *Biotechnology and Bioengineering* 98(5):1017 - 1028.
- Islam RS, Tisi D, Levy MS, Lye GJ. 2007. Framework for the rapid optimization of soluble protein expression in *Escherichia coli* combining microscale experiments and statistical experimental design. *Biotechnology Progress* 23(4):785-793.
- Islam RS, Tisi D, Levy MS, Lye GJ. 2008. Scale-up of *Escherichia coli* growth and recombinant protein expression conditions from microwell to laboratory and pilot scale based on matched k(L)a. *Biotechnology and Bioengineering* 99(5):1128 - 1139.
- Jaeger KE, Dijkstra BW, Reetz MT. 1999. Bacterial biocatalysts: Molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annual Review of Microbiology* 53:315-+.
- Jakoby M, Ngouoto-Nkili CE, Burkovski A. 1999. Construction and application of new *Corynebacterium glutamicum* vectors. *Biotechnology Techniques* 13(6):437-441.
- Jenzsch M, Simutis R, Lübbert A. 2006. Optimization and Control of Industrial Microbial Cultivation Processes. *Engineering in Life Sciences* 6(2):117-124.
- Jeude M, Dittrich B, Niederschulte H, Anderlei T, Knocke C, Klee D, Büchs J. 2006. Fed-batch mode in shake flasks by slow-release technique. *Biotechnology and Bioengineering* 95(3):433-445.
- John GT, Klimant I, Wittmann C, Heinzle E. 2003. Integrated optical sensing of dissolved oxygen in microtiter plates: A novel tool for microbial cultivation. *Biotechnology and Bioengineering* 81(7):829-836.
- Jones RC, Anthony RM. 1977. The relationship between nutrient feed rate and specific growth rate in fed batch cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology* 4(2):87-92.
- Ju LK, Chase GG. 1992. Improved Scale-up Strategies of Bioreactors. *Bioprocess Engineering* 8(1-2):49-53.
- Juran JM. 1967. The QC Circle Phenomenon. New York: ASQC.
- Kalinowski J, Bathe B, Bartels D, Bischoff N, Bott M, Burkovski A, Dusch N, Eggeling L, Eikmanns BJ, Gaigalat L and others. 2003. The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of l-aspartate-derived amino acids and vitamins. *Journal of Biotechnology* 104(1-3):5-25.

- Keilhauer C, Eggeling L, Sahm H. 1993. Isoleucine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*: molecular analysis of the ilvB-ilvN-ilvC operon. *Journal of Bacteriology* 175(17):5595-5603.
- Kensy F, Engelbrecht C, Buchs J. 2009a. Scale-up from microtiter plate to laboratory fermenter: evaluation by online monitoring techniques of growth and protein expression in *Escherichia coli* and *Hansenula polymorpha* fermentations. *Microbial Cell Factories* 8(1):68.
- Kensy F, Muller C. 2007. Automated and quantitative upstream processing in shaken microbioreactor arrays. *Journal of Biotechnology* 131(2):S177-S178.
- Kensy F, Zang E, Faulhammer C, Tan R-K, Buchs J. 2009b. Validation of a high-throughput fermentation system based on online monitoring of biomass and fluorescence in continuously shaken microtiter plates. *Microbial Cell Factories* 8(1):31.
- Kensy F, Zimmermann HF, Knabben I, Anderlei T, Trauthwein H, Dingerdissen U, Buchs J. 2005. Oxygen transfer phenomena in 48-well microtiter plates: Determination by optical monitoring of sulfite oxidation and verification by real-time measurement during microbial growth. *Biotechnology and Bioengineering* 89(6):698-708.
- Kikuchi Y, Itaya H, Date M, Matsui K, Wu L-F. 2008a. Production of *Chryseobacterium proteolyticum* protein-glutaminase using the twin-arginine translocation pathway in *Corynebacterium glutamicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 78(1):67-74.
- Kikuchi Y, Itaya H, Date M, Matsui K, Wu LF. 2008b. Production of *Chryseobacterium proteolyticum* protein-glutaminase using the twin-arginine translocation pathway in *Corynebacterium glutamicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 78(1):67-74.
- Kimura M. 1963. The effect of biotin on the amino acid biosynthesis by *Micrococcus glutamicus*. *J Gen Appl Microbiol* 9:205-212.
- Kipke K. 1985. Auslegung von Industrie-Rührwerken. *Chemie Ingenieur Technik* 57(10):813-823.
- Knorr B, Schlieker H, Hohmann H-P, Weuster-Botz D. 2007. Scale-down and parallel operation of the riboflavin production process with *Bacillus subtilis*. *Biochemical Engineering Journal* 33(3):263-274.
- Konz JO, King J, Cooney CL. 1998. Effects of oxygen on recombinant protein expression. *Biotechnology Progress* 14(3):393-409.
- Korneli C, David F, Godard T, Franco-Lara E. 2011. Influence of fructose and oxygen gradients on fed-batch recombinant protein production using *Bacillus megaterium*. *Engineering in Life Sciences* 11(4):338-349.

- Kramer W, Mattanovich, D., Elmecker, G., Weik, R., Lüttich, Ch., Bayer, K., Katinger, H.. . 1994. Regulable expression systems for the optimisation of recombinant protein production in *Escherichia coli*. In: Alberghina L, Frontali, L., P. Sensi, P., editor. Progress in biotechnology 9. Amsterdam: Elsevier. p 827-830.
- Krauss U, Lee J, Benkovic S, J., Jaeger K-E. 2009. LOVely enzymes - towards engineering light-controllable biocatalysts. *Microbial Biotechnology* 3(1):15-23.
- Kunst F, Ogasawara N, Moszer I, Albertini AM, Alloni G, Azevedo V, Bertero MG, Bessi res P, Bolotin A, Borchert S and others. 1997. The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*.
- Lee C, Sun WJ, Burgess BW, Junker BH, Reddy J, Buckland BC, Greasham RL. 1997. Process optimization for large-scale production of TGF- α -PE40 in recombinant *Escherichia coli*: Effect of medium composition and induction timing on protein expression. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 18(4):260-266.
- Leggewie C, Degering C, Puls M, Eggert T. 2010. Produktionsoptimierung industrieller Proteine mit der Sekretions-Toolbox. *Chemie Ingenieur Technik* 82(9):1499-1499.
- Legmann R, Schreyer HB, Combs RG, McCormick EL, Russo AP, Rodgers ST. 2009. A Predictive High-Throughput Scale-Down Model of Monoclonal Antibody Production in CHO Cells. *Biotechnology and Bioengineering* 104(6):1107-1120.
- Leloup L, Haddaoui EA, Chambert R, PetitGlatron MF. 1997. Characterization of the rate-limiting step of the secretion of *Bacillus subtilis* α -amylase overproduced during the exponential phase of growth. *Microbiology-Uk* 143:3295-3303.
- Levisauskas DL, Galvanauskas VG, Henrich SH, Wilhelm KW, Volk NV, Lübbert AL. 2003. Model-based optimization of viral capsid protein production in fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 25(4):255-262.
- Lewis WK, Whitman WG. 1924. Principles of Gas Absorption. *Industrial & Engineering Chemistry* 16(12):1215-1220.
- Li P, Beckwith J, Inouye H. 1988. Alteration of the amino terminus of the mature sequence of a periplasmic protein can severely affect protein export in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85(20):7685-7689.
- Lide DR. 2000. Concentrative Properties of Aqueous Solutions: Density, Refractive Index, Freezing Point Depression, and Viscosity. In: Lide DR, editor. *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 87th ed. Internet Version 2007, (87th Edition) ed. Boca Raton, FL: Taylor and Francis Group. p 8-57 - 8-83

- Liebl W, Klamer R, Schleifer K-H. 1989. Requirement of chelating compounds for the growth of <i>Corynebacterium glutamicum</i> in synthetic media. *Applied Microbiology and Biotechnology* 32(2):205-210.
- Link H, Weuster-Botz D. 2006. Genetic algorithm for multi-objective experimental optimization. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 29(5):385-390.
- Luan C-H, Qiu S, Finley JB, Carson M, Gray RJ, Huang W, Johnson D, Tsao J, Reboul J, Vaglio P and others. 2004. High-Throughput Expression of *C. elegans* Proteins. *Genome Research* 14(10b):2102-2110.
- Luedeking R, Piret EL. 1959. A Kinetic Study of the Lactic Acid Fermentation - Batch Process at Controlled Ph. *Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering* 1(4):393-412.
- Maier U, Büchs J. 2001. Characterisation of the gas-liquid mass transfer in shaking bioreactors. *Biochem Eng J* 7(2):99 - 106.
- Malthus TR. 1798. *An Essay on the Principle of Population*. London.
- Mandenius C-F, Brundin A. 2008a. Bioprocess optimization using design-of-experiments methodology. *Biotechnology Progress* 24(6):1191-1203.
- Mandenius CF, Brundin A. 2008b. Bioprocess optimization using design-of-experiments methodology. *Biotechnology Progress* 24(6):1191 - 1203.
- Manning MC, Patel K, Borchardt RT. 1989. Stability of Protein Pharmaceuticals. *Pharmaceutical Research* 6(11):903-918.
- Marques MPC, Cabral JMS, Fernandes P. 2010. Bioprocess scale-up: quest for the parameters to be used as criterion to move from microreactors to lab-scale. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 85(9):1184-1198.
- Maurer M, Kuhleitner M, Gasser B, Mattanovich D. 2006. Versatile modeling and optimization of fed batch processes for the production of secreted heterologous proteins with *Pichia pastoris*. *Microbial Cell Factories* 5(1):37.
- Maurizi MR, Brabson JS, Switzer RL. 1978. Immunochemical studies of the inactivation of aspartate transcarbamylase by stationary phase *Bacillus subtilis* cells. Evidence for selective, energy-dependent degradation. *Journal of Biological Chemistry* 253(16):5585-5593.
- Mavituna F. 1996. Strategies for bioreactor scale-up, . In: Moreira ARW, K. K. , editor. *Computer and Information Science Application in Bioprocess Engineering* Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers. p 125-142.

- May BK, Elliott WH. 1968. Characteristics of extracellular protease formation by *Bacillus subtilis* and its control by amino acid repression. *Biochimica et Biophysica Acta* 157(3):607-615.
- Meissner D, Vollstedt A, van Dijk J, Freudl R. 2007. Comparative analysis of twin-arginine (Tat)-dependent protein secretion of a heterologous model protein (GFP) in three different Gram-positive bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* 76(3):633-642.
- Mrotzek C, Anderlei T, Henzler H-J, Büchs J. 2001. Mass transfer resistance of sterile plugs in shaking bioreactors. *Biochemical Engineering Journal* 7(2):107-112.
- Mukherjee AK, Adhikari H, Rai SK. 2008. Production of alkaline protease by a thermophilic *Bacillus subtilis* under solid-state fermentation (SSF) condition using *Imperata cylindrica* grass and potato peel as low-cost medium: Characterization and application of enzyme in detergent formulation. *Biochemical Engineering Journal* 39(2):353-361.
- Nealon AJ, Willson KE, Pickering SC, Clayton TM, O'Kennedy RD, Titchener-Hooker NJ, Lye GJ. 2005. Use of operating windows in the assessment of integrated robotic systems for the measurement of bioprocess kinetics. *Biotechnology Progress* 21(1):283-91.
- Neubauer P, Haggström L, Enfors SO. 1995. Influence of substrate oscillations on acetate formation and growth yield in *Escherichia coli* glucose limited fed-batch cultivations. *Biotechnology and Bioengineering* 47(2):139-146.
- Neubauer P, Lin HY, Mathisizik B. 2003. Metabolic load of recombinant protein production: Inhibition of cellular capacities for glucose uptake and respiration after induction of a heterologous gene in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering* 83(1):53-64.
- Ohmuru K, Nakamura K, Yamazaki H, Shiroza T, Yamane K, Jigami Y, Tanaka H, Yoda K, Yamasaki M, Tamura G. 1984. Length and structural effect of signal peptides derived from *Bacillus subtilis* α -amylase on secretion of *Escherichia coli* β -lactamase in *B. subtilis* cells. *Nucleic Acids Research* 12(13):5307-5319.
- Pakula TM, Salonen K, Uusitalo J, Penttilä M. 2005. The effect of specific growth rate on protein synthesis and secretion in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Microbiology-Sgm* 151:135-143.
- Palva I. 1982. Molecular cloning of α -amylase gene from *Bacillus amyloliquefaciens* and its expression in *B. subtilis*. *Gene* 19(1):81-87.
- Panula-Perala J, Siurkus J, Vasala A, Wilmanowski R, Casteleijn MG, Neubauer P. 2008. Enzyme controlled glucose auto-delivery for high cell density cultivations in microplates and shake flasks. *Microbial Cell Factories* 7.

- Park S, Ramirez WF. 1989. Dynamics of Foreign Protein Secretion from *Saccharomyces-Cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering* 33(3):272-281.
- Park SJ, Lee SY, Cho J, Kim TY, Lee JW, Park JH, Han MJ. 2005. Global physiological understanding and metabolic engineering of microorganisms based on omics studies. *Applied Microbiology and Biotechnology* 68(5):567-579.
- Peterson JJ, Young DS. 1968. Evaluation of the hexokinase/glucose-6-phosphate dehydrogenase method of determination of glucose in urine. *Analytical Biochemistry* 23(2):301-316.
- Pierce JA, Robertson CR, Leighton TJ. 1992. Physiological and genetic strategies for enhanced subtilisin production by *Bacillus subtilis*. *Biotechnology Progress* 8(3):211-218.
- Puskeiler R, Kaufmann K, Weuster-Botz D. 2005a. Development, parallelization, and automation of a gas-inducing milliliter-scale bioreactor for high-throughput bioprocess design (HTBD). *Biotechnology and Bioengineering* 89(5):512 - 523.
- Puskeiler R, Kusterer A, John GT, Weuster-Botz D. 2005b. Miniature bioreactors for automated high-throughput bioprocess design (HTBD): reproducibility of parallel fed-batch cultivations with *Escherichia coli*. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 42(Pt 3):227 - 235.
- Rathore A, Bhambure R, Ghare V. 2010. Process analytical technology (PAT) for biopharmaceutical products. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 398(1):137-154.
- Rey M, Ramaiya P, Nelson B, Brody-Karpin S, Zaretsky E, Tang M, de Leon A, Xiang H, Gusti V, Clausen I and others. 2004. Complete genome sequence of the industrial bacterium *Bacillus licheniformis* and comparisons with closely related *Bacillus species*. *Genome Biology* 5(10):1-12.
- Riesenberg D. 1991. High-cell-density cultivation of *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology* 2(3):380-384.
- Riesenberg D, Menzel K, Schulz V, Schumann K, Veith G, Zuber G, Knorre WA. 1990. High cell density fermentation of recombinant *Escherichia coli* expressing human interferon alpha 1. *Applied Microbiology and Biotechnology* 34(1):77-82.
- Rosenau F, Tommassen J, Jaeger KE. 2004. Lipase-specific foldases. *ChemBioChem* 5(2):153-161.
- Rosenberg AH, Lade BN, Dao-shan C, Lin S-W, Dunn JJ, Studier FW. 1987. Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. *Gene* 56(1):125-135.

- Rucker E, Schneider G, Steinhauser K, Lower R, Hauber J, Stauber RH. 2001. Rapid evaluation and optimization of recombinant protein production using GFP tagging. *Protein Expression and Purification* 21(1):220-223.
- Rushton JHC, E.W.; Everett H.J. . 1950. Power characteristics of mixing impellers. *Chemical Engineering Progress* 46:395-404.
- Samorski M, Muller-Newen G, Buchs J. 2005. Quasi-continuous combined scattered light and fluorescence measurements: a novel measurement technique for shaken microtiter plates. *Biotechnology and Bioengineering* 92(1):61-68.
- Sandén AM, Prytz I, Tubulekas I, Förberg C, Le H, Hektor A, Neubauer P, Pragai Z, Harwood C, Ward A and others. 2003. Limiting factors in *Escherichia coli* fed-batch production of recombinant proteins. *Biotechnology and Bioengineering* 81(2):158-166.
- Scheidle M, Jeude M, Dittrich B, Denter S, Kensy F, Suckow M, Klee D, Buchs J. 2010. High-throughput screening of *Hansenula polymorpha* clones in the batch compared with the controlled-release fed-batch mode on a small scale. *Fems Yeast Research* 10(1):83-92.
- Schlüter V, Deckwer WD. 1992. Gas/liquid mass transfer in stirred vessels. *Chemical Engineering Science* 47(9–11):2357-2362.
- Schmid A, Dordick JS, Hauer B, Kiener A, Wubbolts M, Witholt B. 2001. Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature* 409(6817):258-268.
- Schmidt FR. 2005. Optimization and scale up of industrial fermentation processes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 68(4):425 - 435.
- Schneider J, Wendisch V. 2010. Putrescine production by engineered *Corynebacterium glutamicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 88(4):859-868.
- Schrumpf B. 1991. Lysinbildung mit *Corynebacterium glutamicum*: Analyse des Metabolitflusses durch Bestimmung zellinterner Aminosäurekonzentrationen und enzymatische Untersuchungen. Jülich: Forschungszentrum. 107 p.
- Schweissgut O, Wiechert W. Global exploration of optimization landscapes for nonlinear ill posed parameter estimation problems. In: M. Snorek ZB, M. Cepek, J. Drchal, editor; 2010; Prague.
- Shimizu K. 1996. A tutorial review on bioprocess systems engineering. *Computers & Chemical Engineering* 20(6-7):915-941.
- Shivhare MM, Graham 2010. Practical Considerations for DoE Implementation in Quality By Design. *BioProcess International* 8(6):22–30.

- Siegel R, Ryu DDY. 1985. Kinetic study of instability of recombinant plasmid pPLc23trpAl in *E. coli* using two-stage continuous culture system. *Biotechnology and Bioengineering* 27(1):28-33.
- Simonen M, Palva I. 1993. Protein secretion in *Bacillus* species. *Microbiological Reviews* 57(1):109-137.
- Siurkus J, Panula-Perala J, Horn U, Kraft M, Rimseliene R, Neubauer P. 2010. Novel approach of high cell density recombinant bioprocess development: Optimisation and scale-up from microlitre to pilot scales while maintaining the fed-batch cultivation mode of *E. coli* cultures. *Microbial Cell Factories* 9(1):35.
- Stephanopoulos G. 1999. Metabolic Fluxes and Metabolic Engineering. *Metabolic Engineering* 1(1):1-11.
- Storhas W. 1994. Bioreaktoren und periphere Einrichtungen. Heidelberg: Vieweg.
- Studier FW. 2005. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr Purif* 41(1):207 - 234.
- Teramoto H, Watanabe K, Suzuki N, Inui M, Yukawa H. 2011. High yield secretion of heterologous proteins in *Corynebacterium glutamicum* using its own Tat-type signal sequence. *Applied Microbiology and Biotechnology* 91(3):677-687.
- Terpe K. 2006. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology* 72(2):211-222.
- Thwaite JE, Baillie LWJ, Carter NM, Stephenson K, Rees M, Harwood CR, Emmerson PT. 2002. Optimization of the cell wall microenvironment allows increased production of recombinant *Bacillus anthracis* protective antigen from *B. subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology* 68(1):227-234.
- Tjalsma H, Antelmann H, Jongbloed JDH, Braun PG, Darmon E, Dorenbos R, Dubois J-YF, Westers H, Zanen G, Quax WJ and others. 2004. Proteomics of Protein Secretion by *Bacillus subtilis*: Separating the “Secrets” of the Secretome. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68(2):207-233.
- Tjalsma H, Bolhuis A, Jongbloed JDH, Bron S, van Dijl JM. 2000. Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64(3):515-+.

- Turner C, Gregory ME, Turner MK. 1994. A Study of the Effect of Specific Growth-Rate and Acetate on Recombinant Protein-Production of *Escherichia-Coli* Jm107. *Biotechnology Letters* 16(9):891-896.
- Vallino JJ, Stephanopoulos G. 1993. Metabolic flux distributions in *Corynebacterium glutamicum* during growth and lysine overproduction. *Biotechnology and Bioengineering* 41(6):633-646.
- Van't Riet K. 1979. Review of Measuring Methods and Results in Nonviscous Gas-Liquid Mass Transfer in Stirred Vessels. *Industrial & Engineering Chemistry Process Design and Development* 18(3):357-364.
- Veith B, Herzberg C, Steckel S, Feesche J, Maurer KH, Ehrenreich P, Bäumer S, Henne A, Liesegang H, Merkl R and others. 2004. The Complete Genome Sequence of *Bacillus licheniformis* DSM13, an Organism with Great Industrial Potential. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 7(4):204-211.
- von der Osten CH, Gioannetti C, Sinskey AJ. 1989. Design of a defined medium for growth of *Corynebacterium glutamicum* in which citrate facilitates iron uptake. *Biotechnology Letters* 11(1):11-16.
- von Glasow P. 2011. m2p-labs bietet Fermentationsautomatisierung mit Marktführer an. Pressemitteilung m2p-labs. Baesweiler/Aachen: m2p-labs.
- von Heijne G. 1986. A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucleic Acids Research* 14(11):4683-4690.
- Walsh G. 2010. Biopharmaceutical benchmarks 2010. *Nature Biotechnology* 28(9):917-924.
- Watanabe K, Tsuchida Y, Okibe N, Teramoto H, Suzuki N, Inui M, Yukawa H. 2009. Scanning the *Corynebacterium glutamicum* R genome for high-efficiency secretion signal sequences. *Microbiology* 155(3):741-750.
- Weickert MJ, Doherty DH, Best EA, Olins PO. 1996. Optimization of heterologous protein production in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology* 7(5):494-499.
- Weiner JH, Bilous PT, Shaw GM, Lubitz SP, Frost L, Thomas GH, Cole JA, Turner RJ. 1998. A Novel and Ubiquitous System for Membrane Targeting and Secretion of Cofactor-Containing Proteins. *Cell* 93(1):93-101.
- Westers L, Westers H, Quax WJ. 2004. *Bacillus subtilis* as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1694(1-3):299-310.

- Weuster-Botz D. 1999. Die Rolle der Reaktionstechnik in der mikrobiellen Verfahrenstechnik. Jülich: Forschungszentrum Jülich.
- Weuster-Botz D. 2000. Experimental design for fermentation media development: Statistical design or global random search? *Journal of Bioscience and Bioengineering* 90(5):473 - 483.
- Weuster-Botz D, Kelle R, Frantzen M, Wandrey C. 1997. Substrate Controlled Fed-Batch Production of l-Lysine with *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnology Progress* 13(4):387-393.
- Wilms B, Hauck A, Reuss M, Syldatk C, Mattes R, Siemann M, Altenbuchner J. 2001. High-cell-density fermentation for production of L-N-carbamoylase using an expression system based on the *Escherichia coli* rhaBAD promoter. *Biotechnology and Bioengineering* 73(2):95-103.
- Winkler UK, Stuckmann M. 1979. Glycogen, Hyaluronate, and Some Other Polysaccharides Greatly Enhance the Formation of Exolipase by *Serratia-Marcescens*. *Journal of Bacteriology* 138(3):663-670.
- Wong S-L. 1995. Advances in the use of *Bacillus subtilis* for the expression and secretion of heterologous proteins. *Current Opinion in Biotechnology* 6(5):517-522.
- Wu XC, Lee W, Tran L, Wong SL. 1991. Engineering a *Bacillus subtilis* expression-secretion system with a strain deficient in six extracellular proteases. *Journal of Bacteriology* 173(16):4952-8.
- Yee L, Blanch HW. 1992. Recombinant Protein Expression in High Cell-Density Fed-Batch Cultures of *Escherichia-Coli*. *Bio-Technology* 10(12):1550-1556.
- Yu L. 2008. Pharmaceutical Quality by Design: Product and Process Development, Understanding, and Control. *Pharmaceutical Research* 25(4):781-791.
- Yukawa H, Omumasaba CA, Nonaka H, Kós P, Okai N, Suzuki N, Suda M, Tsuge Y, Watanabe J, Ikeda Y and others. 2007. Comparative analysis of the *Corynebacterium glutamicum* group and complete genome sequence of strain R. *Microbiology* 153(4):1042-1058.
- Zimmermann H, Raebiger T. 2006. Evaluation of the applicability of backscattered light measurements to the determination of microbial cell densities in microtiter plates. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 386(7):2245-2247.
- Zimmermann HF, Rieth J. 2007. A fully automated robotic system for high throughput fermentation. *Clinics in Laboratory Medicine* 27(1):209-+.

Zweers J, Barak I, Becher D, Driessen A, Hecker M, Kontinen V, Saller M, Vavrova Lu, van Dijk J. 2008. Towards the development of *Bacillus subtilis* as a cell factory for membrane proteins and protein complexes. *Microbial Cell Factories* 7(1):10.

1. **Methoden zur integrierten Analyse metabolischer Netzwerke unter stationären und instationären Bedingungen**
von S. A. Wahl (2008), 245 Seiten
ISBN: 978-3-89336-506-7
2. **Strukturelle Untersuchungen an membranassoziierten Proteinen: NMR-Strukturen des HIV-1 Virus Protein U (39-81) und des humanen CD4 (372-433)**
von M. Wittlich (2008), XVIII, 185 Seiten
ISBN: 978-3-89336-510-4
3. **Identifizierung von physiologischen und artifiziellen Liganden von GA-BARAP und Charakterisierung der resultierenden Interaktionen**
von J. Mohrlüder (2008), V, 158 Seiten
ISBN: 978-3-89336-511-1
4. **Struktur und Funktion von Transaminasen aus *Corynebacterium glutamicum***
von J. Marienhagen (2008), VI, 154 Seiten
ISBN: 978-3-89336-512-8
5. **Implementierung eines Funk-Protokolls (IEEE 802.15.4) und Entwicklung eines adaptiven Zeitsynchronisationsverfahrens für ein Netzwerk intelligenter und autarker Sensoren**
von M. Schlösser (2008), 77 Seiten
ISBN: 978-3-89336-519-7
6. **Etablierung und Optimierung der sekretorischen Gewinnung thermostabiler Lipasen in Gram-positiven Bakterien**
von H. Brundiek (2008), VIII, 154 Seiten
ISBN: 978-3-89336-520-3
7. **Visuospatial Attention: Neural Correlates and Pharmacological Modulation in Healthy Subjects and Patients with Spatial Neglect**
by S. Vossel (2008), XIV, 176 pages
ISBN: 978-3-89336-526-5
8. **Analyse des Substratspektrums der ClpCP-Protease aus *Corynebacterium glutamicum***
von J.-E. Schweitzer (2008), V, 130 Seiten
ISBN: 978-3-89336-528-9
9. **Adaptive Verfahren zur automatischen Bildverbesserung kernspintomographischer Bilddaten als Vorverarbeitung zur Segmentierung und Klassifikation individueller 3D-Regionen des Gehirns**
von J. Castellanos (2008), VI, 100 Seiten
ISBN: 978-3-89336-539-5

10. **Posttranslationale Regulation der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase in *Corynebacterium glutamicum***
von C. Schultz (2009), VII, 151 Seiten
ISBN: 978-3-89336-560-9
11. **MtrA, ein bifunktionaler Antwortregulator aus *Corynebacterium glutamicum***
von M. Brocker (2009), VI, 125 Seiten
ISBN: 978-3-89336-561-6
12. **Strukturelle Charakterisierung von GABRAP-Ligand-Interaktionen**
von Y. Thielmann (2009), 166 Seiten (getr. pag.)
ISBN: 978-3-89336-563-0
13. **Acceleration on an image reconstruction algorithm for Positron Emission Tomography using a Graphics Processing Unit**
by T. Felder (2009), 97 pages
ISBN: 978-3-89336-566-1
14. **NMR-Lösungsstruktur der Loopregion Tyr⁶⁷ - Leu⁷⁷ des visuellen Arrestins im Komplex mit photoaktiviertem Rhodopsin**
von S. Feuerstein (2009), XVI, 140 Seiten
ISBN: 978-3-89336-571-5
15. **Development of a Process for the Cleavage of a Mucin Fusion Protein by Enterokinase**
by T. Kubitzki (2009), IV, 133 pages
ISBN: 978-3-89336-575-3
16. **Children's health and RF EMF exposure**
project coord. P. Wiedemann (2009), 49 pages
ISBN: 978-3-89336-594-4
17. **Entwicklung einer Signalerfassungselektronik für eine Halbleiter-Photomultiplier (SiPM) Matrix**
von C. Parl (2009), IV, 128 Seiten
ISBN: 978-3-89336-595-1
18. **Medienorientierung biomedizinischer Forscher im internationalen Vergleich**
Die Schnittstelle von Wissenschaft & Journalismus und ihre politische Relevanz
herausg. von H. P. Peters (2009), 364 Seiten
ISBN: 978-3-89336-597-5
URN: urn:nbn:de: 0001-00542

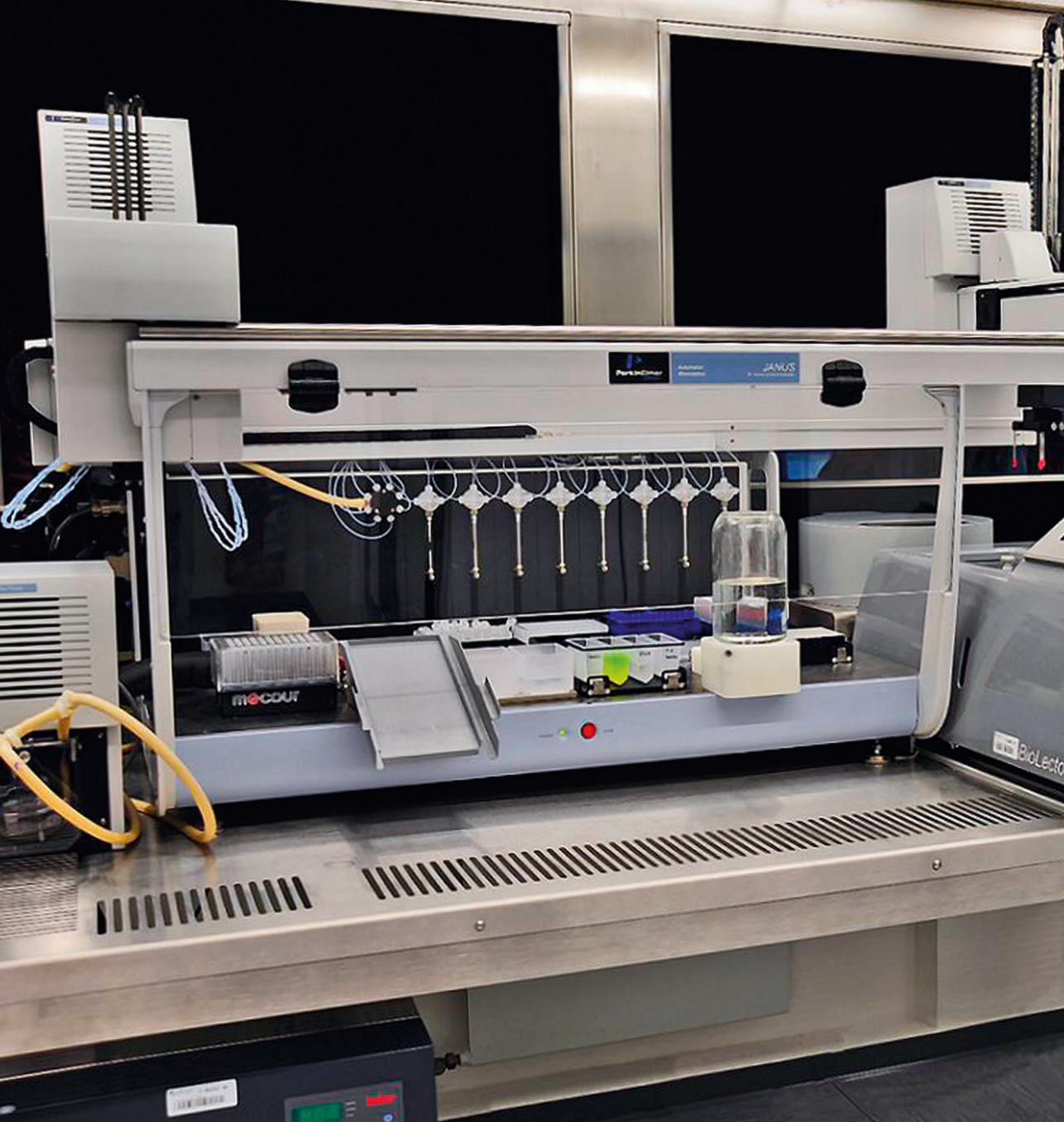
19. **Identifizierung von Interaktionspartnern für HIV-1 Nef und ihre potentielle Relevanz bei der Entwicklung der HIV-assoziierten Demenz**
von J. Mötter (2010), VI, 172 Seiten
ISBN: 978-3-89336-604-0
20. **Biotransformationen mit Cytochrom P450 Monooxygenasen**
von D. Zehentgruber (2010), XI, 147 Seiten
ISBN: 978-3-89336-605-7
21. **Studies on central carbon metabolism and respiration of *Gluconobacter oxydans* 621H**
by T. Hanke (2010), 120 pages
ISBN: 978-3-89336-607-1
22. **Prozessentwicklung zur Produktion von 2-Keto-L-Gulonsäure, einer Vitamin C- Vorstufe**
von B. Osterath (2010), XXI, 213 Seiten
ISBN: 978-3-89336-612-5
23. **Visuell evozierte Antworten der corticalen Areale V1/V2 und V5/MT nach Schachbrettmusterumkehrreizung – Magnetenzecephalographische Untersuchungen in Kombination mit cytoarchitektonischen Wahrscheinlichkeitskarten**
von B. U. Barnikol (2010), III, 138 Seiten
ISBN: 978-3-89336-615-6
24. **Biochemische und regulatorische Analyse des TCA-Zyklus und Glyoxylat-Shunts in *Escherichia coli***
von M. Kunze (2010), 191 Seiten
ISBN: 978-3-89336-620-0
25. **Metabolomanalyse als Grundlage für ¹³C-Stoffflussanalyse und dynamischer Modellierung am Beispiel der Lysinbiosynthese**
von M. G. Wellerdiek (2010), xvi, 182 Seiten
ISBN: 978-3-89336-621-7
26. **Neue Thiamindiphosphat-abhängige Enzyme für die Synthese enantiokomplementärer 2-Hydroxyketone**
von G. Kolter (2010), IX, 168 Seiten
ISBN: 978-3-89336-626-2
27. **Genetische Analyse von Substrat-Translokase-Wechselwirkungen bei der Tat-abhängigen Proteintranslokation in *Escherichia coli***
von F. Lausberg (2010), 174 Seiten
ISBN: 978-3-89336-628-6
28. **Silicium Nanodrähte für die extrazelluläre Ableitung elektrischer Aktivität**
von J. F. Eschermann (2010), xii, 191 Seiten
ISBN: 978-3-89336-639-2

29. **Causality measures between neural signals from invasively and non-invasively obtained local field potentials in humans**
by E. Florin (2010), xxix, 220 pages
ISBN: 978-3-89336-646-0
30. **Regulatory and metabolic aspects of the phosphate starvation response of *Corynebacterium glutamicum***
by H. M. Woo (2010), III, 111 pages
ISBN: 978-3-89336-664-4
31. **Ligand interaction analysis of membrane-anchored proteins**
by J. Glück (2010) VIII, 87 pages (getr. pag.)
ISBN: 978-3-89336-683-5
32. **Novel insights into characteristics, relevance, and regulation of corynebacterial aconitase**
by M. Baumgart (2010), V, 147 pages
ISBN: 978-3-89336-682-8
33. **Investigation of GABARAP complexes with apoptosis-related proteins and structural characterization of GABARAP lipidation**
by P. Ma (2011), VI, 139 pages (getr. pag.)
ISBN: 978-3-89336-699-6
34. **GABARAP-artige Proteine, Nix und Bcl-2: Strukturelle Basis molekularer Interaktionen an der Schnittstelle zwischen Autophagie und Apoptose**
von M. Schwarten (2011), VIII, 164 Seiten (getr. pag.)
ISBN: 978-3-89336-700-9
35. **Einflussfaktoren auf die Stabilität und Aktivität der Benzaldehydlyase aus *Pseudomonas fluorescens* in Carboligasereaktionen mit aromatischen Aldehyden**
von M. Schwarz (2011), XI, 176 Seiten
ISBN: 978-3-89336-701-6
36. **Untersuchungen zur Bildung von D-Aminosäuren mit *Corynebacterium glutamicum***
von N. C. Stäbler (2011), VIII, 104 Seiten
ISBN: 978-3-89336-702-3
37. **Charakterisierung von Wirkstoffen für die Diagnose und Therapie von Morbus Alzheimer**
von D. Bartnik (2011), XII, 105 Seiten
ISBN: 978-3-89336-703-0
38. **Identifizierung und Charakterisierung von Regulatoren der Acyl-CoA Carboxylasen in *Corynebacterium glutamicum***
von J. Nickel (2011), IV, 127 Seiten
ISBN: 978-3-89336-712-2

39. **Metabolische ^{13}C -Stoffflussanalyse vom isotopisch stationären zum instationären Fall**
von K. Grönke (2011), getr. pag.
ISBN: 978-3-89336-713-9
40. **Enzyme supported crystallization of chiral amino acids**
by K. Würges (2011), XI, getr. pag.
ISBN: 978-3-89336-715-3
41. **Systemische Analyse des Citratzyklus in *Corynebacterium glutamicum***
von J. van Ooyen (2011), 116 Seiten
ISBN: 978-3-89336-731-3
42. **Einfluss intrazellulärer Nukleotid-Cofaktoren auf Redoxreaktionen in rekombinanten Ganzellsystemen**
von D. Minör (2011), XII, 138 Seiten
ISBN: 978-3-89336-737-5
43. **Development of ^{18}F -labelled radioligands for molecular imaging of the dopamine D4 receptor**
by F. Kügler (2011), xiv, 161 pages
ISBN: 978-3-89336-738-2
44. **Personalisierte Medizin im Gesundheitssystem der Zukunft. Einflussfaktoren und Szenarien**
von C.R. Karger, B. Hüsing (2011), viii, 99 Seiten
ISBN: 978-3-89336-743-6
45. **Charakterisierung von Proteinen einer neuartigen Signaltransduktionskaskade in *Corynebacterium glutamicum***
von G. Bosco (2011), V, 128 Seiten
ISBN: 978-3-89336-754-2
46. **CopRS and CsoR: two regulatory systems involved in copper homeostasis of *Corynebacterium glutamicum***
by S. V. Schelder (2012), IV, 90 pages
ISBN: 978-3-89336-761-0
47. **Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for efficient succinate production**
by B. O. Litsanov (2012), III, 105 pages
ISBN: 978-3-89336-762-7
48. **Der Oxoglutarat-Dehydrogenase-Komplex in *Corynebacterium glutamicum* und seine Interaktion mit Odhl**
von K. Raasch (2012), VI, 86 Seiten
ISBN: 978-3-89336-764-1

49. **Signaltransduktion in *Corynebacterium glutamicum*:**
Studien zur Rolle von Proteinen mit einer FHA-Domäne
von S. Krawczyk (2012), 125 Seiten
ISBN: 978-3-89336-771-9
50. **Analysis of functional domains of Par-4**
by U.K. Tiruttani Subhramanyam (2012), 85 pages
ISBN: 978-3-89336-766-5
51. **Transcriptional responses and transcriptional regulators of *Gluconobacter oxydans* 621H**
by S. K. Schweikert (2012), XVI, 140 pages
ISBN: 978-3-89336-780-1
52. **Characterization of the human mu opioid receptor:
Structural and functional studies of a G protein-coupled receptor**
by Y. Ma (2012), 129 pages
ISBN: 978-3-89336-767-2
53. **Optimierung der Hydroxynitril-Lyase aus *Arabidopsis thaliana* für die
enantio-selektive Synthese von (R)-Cyanhydrinen**
Entwicklung und Etablierung geeigneter Reaktionsparameter und molekulare
Stabilisierung durch rationales Enzymdesign
von D. Okrob (2012), XV, 135 Seiten
ISBN: 978-3-89336-782-5
54. **Eine kritische Evaluierung FRET-basierter Biosensoren als Werkzeuge für
die quantitative Metabolitanalytik**
von R. Moussa (2012), 113 Seiten
ISBN: 978-3-89336-792-4
55. **Development of Surface-FIDA towards a diagnostic tool for Alzheimer's
disease**
von L. Wang-Dietrich (2012), VI, 103 Seiten
ISBN: 978-3-89336-801-3
56. **Untersuchungen zur sekretorischen Proteingewinnung industriell relevan-
ter Enzyme mit *Corynebacterium glutamicum***
von S. Scheele (2012), vii, 127 Seiten
ISBN: 978-3-89336-815-0
57. **Novel insights into the energy metabolism of *Corynebacterium glutami-
cum* by comprehensive analysis of mutants defective in respiration or
oxidative phosphorylation**
by A. Koch-Körfges (2012), III, 137 pages
ISBN: 978-3-89336-826-6

58. **Prozessnahe Hochdurchsatzoptimierung der heterologen Proteinproduktion in alternativen Wirtsorganismen**
by P. Rohe (2012), 165 Seiten
ISBN: 978-3-89336-834-1



Gesundheit / Health
Band / Volume 58
ISBN 978-3-89336-834-1